

Tag der Promotion: 23.09.2020

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Stephan H. Schirmer

Prof. Dr. med. Hermann Eichler

Aus der Klinik für Innere Medizin III

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Einflüsse von oraler Antikoagulation auf vaskuläres Remodeling

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Philipp Bachmann

geboren am: 10.11.1995 in Engen

„Blut ist ein ganz besondrer Saft.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832) in Faust I (1808)

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung / Summary	5
1.1 Neue orale Antikoagulantien reduzieren atherosklerotische Plaques in und Fibrosierung von Arterien	5
1.2 Novel oral anticoagulants reduce fibrosis and atherosclerotic plaques in arteries.....	6
2 Einleitung	7
2.1 Hintergrund	7
2.2 Mechanismen der Atherosklerose	8
2.3 Mechanismen der Arteriogenese	9
2.4 Bedeutung von Vitamin-K-abhängigen und neuen oralen Antikoagulantien	9
2.5 Einfluss von Edoxaban auf vaskuläre Prozesse	10
2.6 Bedeutung von Vitamin K bei vaskulären Schäden	11
2.7 Ziele der Arbeit	12
3 Material	13
3.1 Kits, Medikamente und Chemikalien.....	13
3.2 Lösungen, Puffer und konventionelle Farbstoffe	14
3.3 Verbrauchsmaterialien	14
3.4 Antikörper für Immunhistochemie.....	15
3.4.1 Primärantikörper	15
3.4.2 Sekundärantikörper	15
3.5 Geräte	15
3.6 Computersoftware	16
4 Methoden.....	17
4.1 Versuchstierbehandlung	17
4.1.1 Allgemeines	17
4.1.2 Etablierung der Futterdosis	17
4.1.3 Überwachung während der Dosisfindung.....	19
4.1.4 Narkosen	19
4.1.5 Blutentnahmen	19
4.1.6 Femoralarterienligatur.....	19
4.1.7 Laser-Doppler-Perfusionsmessungen	20
4.1.8 Tötung und Organentnahme	21
4.2 Histologie	23

4.2.1	Allgemeines und Probengewinnung	23
4.2.2	Ölrot-Färbung	24
4.2.3	Sirius-Red-Färbung.....	24
4.2.4	Immunhistochemische Färbungen	25
4.2.5	Anti-CD68-Färbung.....	25
4.2.6	Anti- α -smooth-muscle-actin-Färbung.....	26
4.3	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR.....	27
4.3.1	RNA-Isolation aus Gewebe	27
4.3.2	Umwandlung der RNA in cDNA.....	27
4.3.3	Amplifikation der cDNA	28
5	Ergebnisse	30
5.1	Etablierung der langfristigen Antikoagulation bei Mäusen	30
5.2	Effekt von Antikoagulation auf die Perfusion und makroskopische Arteriogenese der hinteren Extremität.....	31
5.3	Einfluss von Antikoagulation auf Gefäßprozesse	32
5.3.1	Edoxaban vermindert die Fibrosierung von Gefäßwänden	32
5.3.2	Edoxaban vermindert die atherosklerotische Plaquebildung.....	33
5.3.3	Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die mikroskopisch detektierbare Arteriogenese.....	34
5.3.4	Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die Genexpression von CD68.....	35
5.4	Einfluss von Antikoagulation auf die Genexpression inflammatorischer Zytokine ...	36
5.4.1	Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die Genexpression in Milzzellen.....	36
5.4.2	Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die proinflammatorische Genexpression in Adduktoren.....	37
6	Diskussion.....	38
7	Literaturverzeichnis	43
8	Publikationen	49
9	Dank.....	50

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ANOVA	Analysis of variance
ApoE	Apolipoprotein E
Bcl 2	B-cell lymphoma 2 Protein
C	Celsius
CABG	Koronararterienbypass
CD	cluster of differentiation
cDNA	complimentary DNA
Co	Control (Kontrolle)
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Edo	Edoxaban
FAL	Femoralarterienligatur
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSS	fluid shear stress (Scherkräfte)
Gas 6	Growth arrest-specific-protein 6
HCl	Salzsäure
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
Ko	Kontrolle
LD50	Lethal Dose 50%; Dosis, bei der 50% der Tiere versterben
LDL	Low density lipoprotein
M. / Mm.	Musculus / Musculi
MCP	monocyte chemotactic protein
MGP	Matrix-Gla-Protein
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nm, µm, mm, m,	Nanometer, Mikrometer, Millimeter, Meter

NO	Stickstoffmonoxid
NOAK	neues orales Antikoagulantien
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
pH	pondus Hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PTCA	Percutaneous transluminal coronary angioplasty
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SMC	Smooth muscle cell
Taq	Thermus aquaticus
TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethylrhodamin-5 (und -6)-isothiocyanat
u. a.	unter anderem
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VKA	Vitamin-K-Antagonisten
vs.	versus
Warf	Warfarin
Warfarin + K1	Warfarin + Vitamin K1
WHO	World Health Organization
WTD	Western Type Diet
z. B.	zum Beispiel
µg, mg, g, kg	Mikrogramm, Milligramm, Gramm, Kilogramm

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Neue orale Antikoagulantien reduzieren atherosklerotische Plaques in und Fibrosierung von Arterien

Orale Antikoagulantien reduzieren das Risiko thromboembolischer Ereignisse durch Vorhofflimmern oder eine tiefe Beinvenenthrombose. Faktor-Xa-Inhibitoren reduzieren inflammatorische Prozesse sowie die Proliferation glatter Muskelzellen (smooth muscle cell, SMC) in Gefäßen, wohingegen Vitamin-K-Antagonisten (VKA) durch eine vermehrte Kalzifizierung atherosklerotisches Gefäßremodeling begünstigen. Der Einfluss von Edoxaban im Vergleich zu Warfarin auf adaptives und maladaptives vaskuläres Remodeling ist bisher unbekannt.

Apolipoprotein-E-Knockout Mäuse (ApoE^{-/-}) wurden für acht Wochen mit cholesterinreichem Futter (Kontrolle; Ko, Gruppe 1), sowie zusätzlich mit Warfarin + Vitamin K1 (Warf, Gruppe 2) oder zusätzlich mit Edoxaban (Edo, Gruppe 3) gefüttert. Nach sechs Wochen erfolgte eine Femoralarterienligatur (FAL).

14 Tage nach FAL zeigte sich in der Laser-Doppler-Flussmessung kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen (Ko 0,36±0,05 vs. Warf 0,39±0,09 (p=0,398), Ko vs. Edo 0,51±0,06 (p=0,089), Warf vs. Edo (p=0,828)). Immunhistologisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von SMCs in den Gefäßwänden oder von perivaskulären Makrophagen in beiden Hinterläufen. Die mit Edoxaban behandelten Mäuse wiesen sowohl die größte plaquefreie Fläche in der Aorta auf (Ko 26±11% vs. Edo 38±12% (p=0,024), Ko vs. Warf 31±14% (p=0,300), Edo vs. Warf (p=0,144)), als auch die geringste Fibrosierung der Gefäßwände auf (Ko 3,1±0,9% vs. Edo 1,7±0,6% (p=0,027), Ko vs. Warf 4,1±0,7% (p=0,081), Edo vs. Warf (p<0,001)). Es zeigte sich zwischen den drei Gruppen kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression für inflammatorische Zytokine in Muskelgewebe und der Milz.

Edoxaban reduziert vaskuläre Fibrose in mit Fettfutter gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen. Edoxaban, jedoch nicht Warfarin, schützt vor atherosklerotischen Läsionen im Aortensinus. Diese Daten legen nahe, dass Edoxaban maladaptives Gefäßremodeling reduziert. Die Beurteilung der klinischen Relevanz sollte in weiteren Studien untersucht werden.

1.2 Novel oral anticoagulants reduce fibrosis and atherosclerotic plaques in arteries

Oral anticoagulation prevents thromboembolism in atrial fibrillation. Factor Xa inhibitors, like edoxaban, are known to reduce inflammation and proliferation of smooth muscle cells, while vitamin K antagonism can cause vascular calcific damage. The influence of edoxaban compared to warfarin (warf) on vascular remodeling, atherosclerosis and arteriogenesis is unknown.

Apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice were fed cholesterol-rich diet alone (control, Co), with warf+vitamin K1 or with edoxaban (Edo) for eight weeks. After six weeks, femoral artery ligation was performed. There was no difference in hind-limb perfusion restoration between the three groups after 14 days (Co 0.36±0.05 vs. Warf 0.39±0.09 (p=0.398), Co vs. Edo 0.51±0.06 (p=0.089), Warf vs. Edo (p=0.828)) after ligation. Immunohistologically, there was no difference in smooth muscle cell count in both hindlimbs between the three groups or in the amount of perivascular macrophages in collateral-bearing hindlimb tissue. Edoxaban showed the highest amount of plaque-free aortic tissue (Co 26±11% vs. Edo 38±12% (p=0.024), Co vs. Warf 31±14% (p=0.300), Edo vs. Warf (p=0.144)) as well as the least amount of fibrosis (Co 3.1±0.9% vs. Edo 1.7±0.6% (p=0.027), Co vs. Warf 4.1±0.7% (p=0.081), Edo vs. Warf (p<0.001)). No difference in mRNA content of inflammatory cytokines in muscle tissue or spleen was detected between the three groups.

Edoxaban reduces fibrosis in cholesterol-fed ApoE^{-/-} mice, while Warfarin had no effect. Edoxaban but not warfarin prevents atherosclerotic lesions in the aortic sinus. These data suggest that treatment with edoxaban prevents vascular maladaptive remodeling, which might be clinically important.

2 Einleitung

2.1 Hintergrund

Laut einer Schätzung der WHO sind ischämische Herz- und Gefäßerkrankungen aktuell für ca. 31 % aller Todesfälle weltweit verantwortlich, wobei die Quote in den westlichen Industrienationen (wegen der geringeren Sterblichkeit durch Infektionskrankheiten) sogar noch höher liegt und diese Erkrankungen bei unter 65-Jährigen knapp die Hälfte aller Todesfälle verursachen (WHO, 2016). In Deutschland waren 2016 unter den zehn häufigsten Todesursachen vaskuläre Erkrankungen und ischämische Herzerkrankungen mit ihren Folgekrankheiten alleine für über 37,2 % aller Todesfälle verantwortlich, wobei die Dunkelziffer höchstwahrscheinlich noch deutlich darüber liegt (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2016). Trotz vermehrter Präventionsmaßnahmen und einer besseren medizinischen Versorgung werden kardiovaskuläre Ereignisse und dadurch resultierende, bleibende Schäden bis hin zum Tod in den nächsten Jahren weiter zunehmen, bedingt auch durch eine Alterung der Gesellschaft.

Verschiedene dynamische Umbauvorgänge verändern unser Gefäßsystem nachhaltig, hierbei kann man zwischen dem adaptiven Gefäßremodeling, auch Arteriogenese genannt, und dem maladaptiven Gefäßremodeling, der Atherosklerose, unterscheiden. Die maladaptive Atherosklerose ist ein wichtiger Bestandteil des Prozesses, der zu ischämischen Gefäßerkrankungen führt (FREEDMAN, 1992). Ihr Größenwachstum wird durch die Proliferation glatter Muskelzellen mit anschließender Kalzifikation der inflammatorisch veränderten Gefäßwand ausgelöst, woraus die Ausbildung einer Neointima resultiert. Bislang sind die Auswirkungen von neuen oralen Antikoagulantien (NOAK) auf atherosklerosefördernde Vorgänge wie Leukozytenaktivierung (z. B. Monozyten) oder die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen noch nicht ausreichend geklärt, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass der Faktor Xa promotogene Auswirkungen auf glatte Muskelzellen besitzt (BÖHM et al., 2013; KOO, KIM, 2003). Aus diesem Grund ist es umgekehrt naheliegend, dass eine Inhibierung des Faktors Xa zu einer langsameren Größenzunahme der Neointima führt.

Die meisten kardiovaskulären Ereignisse entstehen durch maladaptive Gefäßumbauprozesse, zu denen auch die Atherosklerose gehört, welche den Verschluss eines Gefäßes bedingen kann (BENJAMIN et al., 2018; DAVIES, 2000). Zu Atherosklerose-Folgeerkrankungen zählen die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und der ischämische Apoplex. Dabei geht eine vermehrte Kollateralisierung mit einer verminderten Mortalität einher (SEILER et al., 2013), weshalb eine Erforschung dieser Mechanismen sinnvoll ist. Zum heutigen Zeitpunkt können bereits für viele Patienten Therapien angeboten werden, die das Überleben und die Lebensqualität verbessern, darunter die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) bei Vorliegen eines akuten

Koronarsyndroms (ACS) (NEUMANN et al., 2019) oder die Implantation eines Koronararterienbypasses (CABG), z. B. bei Patienten mit koronarer Dreigeßßerkrankung und eingeschränkter systolischer linksventrikulärer Funktion (PETRIE et al., 2016). Allerdings lassen sich diese Behandlungsverfahren nicht bei allen Patienten einsetzen, u. a. wegen einer zu weit fortgeschrittenen Atherosklerose (MALIK, TIVAKARAN, 2018) oder zu vielen Komorbiditäten. Hier kommt der Primär- und Sekundärprävention ein besonderer Stellenwert zu (TURK et al., 2009).

2.2 Mechanismen der Atherosklerose

Im Laufe des Lebens erfährt das Gefäßsystem des Menschen eine Reihe von Veränderungen und Umbauvorgängen. Ein wichtiger Vorgang ist die Atherosklerose, im Volksmund auch als Gefäßverkalkung bezeichnet, die zu einer Stenosierung des betroffenen Gefäßes führt. Bereits im 19. Jahrhundert wurde die Entstehung der Atherosklerose erforscht (VIRCHOW, 1856), seitdem wurden verschiedene Hypothesen zu deren Entstehung aufgestellt (DUGUID, 1949; FRENCH, 1966). Ein heutzutage noch genutzter, möglicher Erklärungsansatz ist die sogenannte "response-to-injury"-Hypothese von Russel Ross (ROSS et al., 1977). Sie besagt, dass es durch verschiedene Faktoren, z. B. Traumata, arterielle Hypertonie oder Toxine zu einer Verletzung der Intima einer Arterie kommt. Ein weiterer Faktor für die Entstehung von Atherosklerose ist der Blutfluss, denn an Stellen im Gefäßsystem mit einem turbulenten Fluss, z. B. an Gefäßbifurkationen oder hinter Flussbehinderungen wie Stenosen, konnten vermehrt atherosklerotische Läsionen detektiert werden (PRADO et al., 2008). Durch diese initiale Verletzung bzw. Stress durch turbulenten Blutfluss lassen sich zum einen eine Proliferation von glatten Muskelzellen durch Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine und ihre Migration aus der mehrschichtigen Media in die Intima beobachten, zum anderen die Ausbildung von Schaumzellen aus Monozyten durch eine vermehrte Fetteinlagerung. Der Prozess der Fetteinlagerung in die Zelle konnte auch bei Makrophagen gezeigt werden (MOORE, TABAS, 2011). Diese Ausbildung von Schaumzellen und ihre Nekrose bewirken eine inflammatorische Reaktion, welche mit der Zeit auf alle Schichten der Arterienwand übergreifen kann (LIBBY, 2002; SCHIRMER et al., 2009a). In der Folge kommt es zu einem Gewebeumbau, der sich an der Bildung einer in die Arterie reichenden, bindegewebigen (fibrotischen) Kappe mit einem darin enthaltenen Lipidkern mit einem hohen Anteil an oxidierten LDL-Partikeln, dem Inhalt vieler abgestorbener Schaumzellen, zeigt (RANDOLPH, 2014). Bei der Nekrose wird Calcium freigesetzt, dieses fällt im fortgeschrittenen Stadium aus und ist mitverantwortlich für die starren Gefäßverkalkungen (SEIMON, TABAS, 2009). Je älter ein Mensch ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass in seinem Körper atherosklerotische Prozesse stattgefunden haben (WANG, BENNETT, 2012).

2.3 Mechanismen der Arteriogenese

Die Arteriogenese, die auch mit Kollateralarterienwachstum übersetzt werden kann, führt zu einer Vergrößerung einer präexistenten Verbindungen zwischen zwei Arterien; gefördert wird sie durch einen Druckgradienten, der durch die Stenosierung einer Arterie entsteht, und der in erhöhten Scherkräften (fluid shear stress, FSS) in der Kollateralverbindung mündet (CARMELIET, 2000). Wenn dieser Vorgang ausreichend voranschreitet und sich große Kollateralarterienkreisläufe ausgebildet haben, können selbst komplette Gefäßverschlüsse über diese Kollateralen kompensiert werden. Patienten mit ausreichend gebildeten Kollateralarterien haben oftmals kleinere oder keine Ischämieareale und deshalb eine signifikant geringere Sterblichkeit als Patienten ohne jegliche kompensatorische Kollateralkreisläufe (MEIER et al., 2012).

Für die Arteriogenese sind inflammatorische Zellen und Zytokine von entscheidender Bedeutung, wogegen exzessive Inflammation den adaptiven Prozess des Gefäßwachstums bremst. Durch den FSS kommt es durch die Freisetzung von Integrinen (SHYY, CHIEN, 1997) zu einer Aktivierung des Endothels und der umgebenden glatten Muskelzellen, welches dadurch proliferiert (SCHAPER et al., 1976). Die proliferierten Endothelzellen setzen wiederum Adhäsionsmoleküle an ihrer luminalen Oberfläche frei, welche die Migration von Leukozyten fördern. Zu diesen Zytokinen zählen das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), das vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) sowie die intercellular adhesion molecules 1 und 2 (ICAM-1 und ICAM-2) (SCHOLZ et al., 2000) und Stickstoffmonoxid (NO). Dadurch kommt es zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels, was die Migration von zirkulierenden Monozyten in den perivaskulären Raum erleichtert, wo diese zu Makrophagen differenzieren (CHENG et al., 2007; VRIES et al., 2015). Diese Makrophagen sezernieren verschiedene proinflammatorische Zytokine, darunter MCP-1, welches wiederum Monozyten anlockt und den Tumornekrosefaktor alpha (TNFalpha), welcher für ein proinflammatorisches Milieu im perivaskulären Raum sorgt (ARRAS et al., 1998). Durch die Produktion von promotogenen Substanzen kommt es nach einer Destruktion des umliegenden Gewebes zu einem Wachstum der Kollateralarterien (SCHAPER, 2009).

2.4 Bedeutung von Vitamin-K-abhängigen und neuen oralen Antikoagulantien

Bis vor wenigen Jahren waren Vitamin-K-Antagonisten (VKA) (Warfarin, Phenprocoumon, etc.) Standardmedikamente für die orale Antikoagulation. Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung der Vitamin-K-abhängigen γ -Carboxylierung der vier in der Leber gebildeten Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, wodurch eine dosisabhängige, gerinnungshemmende Wirkung

entsteht, welche üblicherweise über die Thromboplastinzeit (Quick- oder INR-Wert) gemessen werden kann (FREEDMAN, 1992).

Nicht-Vitamin-K-abhängige Antikoagulantien (NOAK) werden gemäß aktueller Leitlinien z. B. zur Prophylaxe von systemischen Thromboembolien bei Vorhofflimmern sowie zur therapeutischen Antikoagulation bei tiefen Venenthrombosen und Lungenembolien eingesetzt. Vorteil dieser Medikamente gegenüber den VKA ist, dass sie ihnen in ihrer antikoagulatorischen Wirkung nicht unterlegen, aber in Hinsicht auf Blutungskomplikationen überlegen sind (GIUGLIANO et al., 2013; SCHIRMER et al., 2010). Dies ist teilweise durch die deutlich kürzere Halbwertszeit von Edoxaban (10 - 14 Stunden) (PARASRAMPURIA, TRUITT, 2016) im Vergleich zu Phenprocoumon (110 - 130 Stunden) (JAHNCHEN et al., 1976) und Warfarin (35 - 45 Stunden) (PALARETI, LEGNANI, 1996) erklärbar, da bereits nach deutlich kürzerer Zeit eine ausreichende Gerinnung vorliegt. Dieser Effekt zeigte sich bereits während der Zulassungsstudien, bei denen damals noch kein Antidot verfügbar war. Seit 2015 ist für den direkten Thrombin-Hemmer Dabigatran das Antidot Idarucizumab zugelassen, seit April 2019 ist in Europa für die Faktor-Xa-Hemmer und Heparin das Antidot Andexanet alfa zugelassen. In kürzlich veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass bei Gabe von Andexanet alfa 79 % der Patienten mit einem großen Blutungsereignis nach Applikation eines Faktor-Xa-Hemmers bereits nach einem Bolus und einer über zwei Stunden verlaufenden Infusion dieses Antidots eine effektive Hämostase entwickelten (CONNOLLY et al., 2019; CONNOLLY et al., 2016). Diese Antidote könnten für eine noch größere Überlegenheit der NOAKs gegenüber VKA hinsichtlich der Blutungskomplikationen führen. Nur bei speziellen Kontraindikationen gegen NOAKs werden weiterhin VKA in der Erstlinientherapie zur initialen Antikoagulation eingesetzt, wie beispielsweise bei Vorliegen einer mechanischen Herzklappe (JAFFER et al., 2015) oder einer Mitralklappenstenose bei gleichzeitigem Vorhofflimmern (BREITHARDT et al., 2014).

2.5 Einfluss von Edoxaban auf vaskuläre Prozesse

Edoxaban ist ein orales Antikoagulans und hemmt in der sekundären Hämostase den Faktor Xa kompetitiv (CAMM, BOUNAMEAUX, 2011). Faktor Xa seinerseits hat neben seiner Funktion als Gerinnungsfaktor als Nebeneffekt einen aktivierenden Einfluss auf die Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand, welche für eine Vergrößerung des atherosklerotischen Plaques verantwortlich sind (KOO, KIM, 2003). Wegen dieses Zusammenhangs lässt sich vermuten, dass Edoxaban durch Hemmung des Faktor Xa zu einer Inhibierung der Teilung glatter Muskelzellen führt und somit atherosklerotische Prozesse verringert werden. Im weiteren Verlauf der Gerinnungskaskade kommt es durch die verminderte Wirkung von Faktor Xa zu einer verminderten Aktivierung von Thrombin (Faktor II) (MANN, 1999). Da aktiviertes Thrombin inflammatorische Prozesse (KALZ et al., 2014) und Stickstoffmonoxid-Synthasen supprimiert (ETO et al., 2001),

welche beide maßgeblich die Atherosklerose aktivieren, kann man bei einer indirekten Hemmung von Thrombin durch die Hemmung von Faktor Xa, z. B. durch Edoxaban, einen positiven Einfluss im Sinne einer verminderten Atherosklerose postulieren.

2.6 Bedeutung von Vitamin K bei vaskulären Schäden

Vitamin K spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese vaskulärer Schäden. Unterschieden wird zwischen Vitamin K1 (Phyllochinon), welches sich vorrangig in der Leber anreichert und bei der Synthese von Gerinnungsfaktoren durch Carboxylierung essentiell ist, und Vitamin K2 (Menachinon), welches sich auf den gesamten Körper verteilt und extrahepatische Carboxylierungsvorgänge ermöglicht. Einer dieser extrahepatischen Carboxylierungsvorgänge durch Vitamin K2 ist die Carboxylierung des Matrix-Gla-Proteins (MGP), welches in dieser Form die vaskuläre Mineralisation hemmt. Das aktive MGP ist auf der einen Seite für das Binden von Hydroxylapatitkristallen zuständig und inhibiert so das Wachstum der Kristalle, auf der anderen Seite hemmt es die Expression des bone-morphogenic-proteins, welches die glatten Muskelzellen der Gefäßwand anregt, sich in Osteoblast-ähnliche Zellen zu differenzieren (YAO et al., 2010). Durch Inhibition des MGP verursachen VKA eine beschleunigte atherosklerotische Plaquebildung (SCHURGERS et al., 2012), weil das Matrix-Gla-Protein die vaskuläre Mineralisation hemmt (YAO et al., 2010) und dessen Inhibition umgekehrt eine beschleunigte Kalzifikation mit daraus resultierender Atherosklerose bewirken würde (LUO et al., 1997; PRICE et al., 1998). Weiterhin hemmen VKA die Aktivierung des Growth arrest-specific protein 6 (Gas 6). Gas 6 schützt die Zellen durch eine Aktivierung des antiapoptotisch wirkenden Protein Bcl-2 (HASANBASIC et al., 2004) und eine Inhibierung des proapoptotischen Proteins Caspase 3 vor dem Zelltod, wodurch es weniger Apoptosekörperchen gibt, an denen Calciumkristalle binden und so die vaskuläre Kalzifikation gehemmt wird. Zusammen mit der Aktivierung von MGP konnte bei nierentransplantierten Patienten durch die Supplementation von Vitamin K2 eine niedrigere arterielle „stiffness“ (lässt sich mit Gefäßwiderstand übersetzen) als Indikator für eine verminderte Atherosklerose gemessen werden (MANSOUR et al., 2017). Durch die Inhibition des MGP und Gas-6 Proteins sorgen VKA folglich für eine gesteigerte Atherosklerose (HOLDEN et al., 2019). Umgekehrt konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von Vitamin K2 zusätzlich zu Warfarin zu einer reduzierten Kalzifikation der Aorta durch Aktivierung von Gas 6 und Bcl2 führt (JIANG et al., 2016).

2.7 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollen im Mausmodell die verschiedenen Umbauprozesse der Gefäße in einer placebokontrollierten, tierexperimentellen Interventionsstudie untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf den Vergleich des Einflusses von Warfarin und Edoxaban auf adaptive und maladaptive Prozesse gelegt, da untersucht werden soll, ob die Gabe von Edoxaban sich günstiger auf Arteriogenese und Atherosklerose auswirkt, als die Gabe von Warfarin. Da diese beiden Prozesse eine große Bedeutung für vaskuläre Ereignisse besitzen, ist ihre Erforschung wichtig für ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge und den daraus resultierenden möglichen neuen Therapieansätzen. Bei einer verminderten Atherosklerose und einer vermehrten Arteriogenese könnte es zu einer Senkung von Mortalität und Morbidität bei Volkskrankheiten wie koronarer Herzkrankheit und Schlaganfällen kommen.

3 Material

3.1 Kits, Medikamente und Chemikalien

Produkt	Hersteller
0,9 % NaCl-Lösung	B. Braun AG, Melsungen
Ampuwa 100 ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.
Aqua destillata	B. Braun AG, Melsungen
Chloroform	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Citraconsäure	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Flüssiges N ₂	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
HCl (konzentriert)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Heparin-Natrium 10.000 IE / ml	B. Braun AG, Melsungen
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Hydroxyproline-Assay-Kit	Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	Merck KGaA, Darmstadt
Ketavet (Ketaminhydrochlorid, 100 mg / ml)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
peqGOLD RNA Pure	VWR International GmbH, Darmstadt
peqGOLD TriFast	VWR International GmbH, Darmstadt
Rimadyl-Injektionslösung	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Rompun (Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI for Fluorescence	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

3.2 Lösungen, Puffer und konventionelle Farbstoffe

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
10x PBS (-Tween)	Für 1000 ml: 80 g NaCl 2 g KCl 2,4 g KH ₂ PO ₄ 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ad 1 l mit A. dest. pH 7,4 (10 ml Tween 20)
1x PBS (-Tween)	Verdünnung des 10x PBS (-Tween) um den Faktor 10
4 % Formaldehyd	Für 100 ml: 4 g Paraformaldehyd 100 ml 1x PBS
Hämatoxylin sauer, nach Ehrlich	Waldeck GmbH, Münster
Ölrot Färbelösung	Waldeck GmbH, Münster
Sirius-Red Färbelösung	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt

3.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Cellstar Pipetten 15 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Combitips Advanced (1,25 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Cover Glas 24 x 60 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Cutfix Einmal-Skalpelle	B. Braun AG, Melsungen
Dako Pen	Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA
Einwegrasierer	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Falcon (50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Light-Duty Tissue Wipers	VWR International GmbH, Darmstadt
Menzel-Gläser (Polysine-Slides)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Microlance 3 Einmalkanüle 20G	BD Medical, Franklin Lakes, NJ, USA
Microlance 3 Einmalkanüle 26G	BD Medical, Franklin Lakes, NJ, USA
Microvette 500	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Mikrotomklingen S35	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka Japan
Objetträgerkasten	VWR International GmbH, Darmstadt
Octeniderm	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. Nürnberg
Vicryl Stärke 6-0	Ethicon Inc. Bridgewater, NJ, USA

3.4 Antikörper für Immunhistochemie

3.4.1 Primärantikörper

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
CD68 Monoclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Monoclonal anti-Mouse α-smooth muscle-actin-FITC antibody	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

3.4.2 Sekundärantikörper

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Goat anti-rat FITC-antibody, IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA

3.5 Geräte

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklaviergerät Tuttnauer EL 3850	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Flockeneisbereiter FM 120 KE	Hoshizaki Electric Co. Ltd., Toyooka, Japan
HandyStep Electronic	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Heizkissen TM20	Beurer GmbH, Ulm
HERAcell 150 CO ₂ Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Homogenisator Potter S	B. Braun AG, Melsungen
Ika Topolino Magnetührer	Ika Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Lab Dancer	VWR International GmbH, Darmstadt
Leica CM 1900 Kryostat	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Metallblockthermostat HTMR 153	HLC Biotech, Bovenden
Mikroskope und Kameras:	
Olympus CK2	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Nikon DS-Qi2 Kamera	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Nikon DS-Ri2 Kamera	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Nikon Eclipse Ni-U	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Moor-LDI2-HR	Moor Instruments, Axminster, UK

NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PeqSTAR 96 Universal Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>pH-Meter 526</i>	<i>WTW GmbH, Weilheim</i>
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Step-One Plus Real-Time PCR	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Transferpette S	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Vortex VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waagen:	
ALC-Series, 0,01 g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY, USA
Zentrifugen:	
Heraeus Megafuge 1,0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Biofuge Pico	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge 1K15	
Centrifuge 5415 D	

3.6 Computersoftware

Produkt	Hersteller
Endnote X6	Thomson Reuters Corporation, New York City, NY, USA
Graphpad Prism 7	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Mac OS 10.13 High Sierra	Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Microsoft Office 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Moor LDI V5 Software	Moor Instruments, Axminster, UK
NanoDrop Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NIS-Elements BR 3.22.10	Nikon Corporation, Tokio, Japan
StepOne Software	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Windows 7	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

4 Methoden

4.1 Versuchstierbehandlung

4.1.1 Allgemeines

Die für diese Studie notwendigen Tierversuche wurden unter der Versuchsnummer 48/2016, konform mit § 8 des Tierschutzgesetzes, von den zuständigen Behörden genehmigt und in enger Überprüfung durch und Zusammenarbeit mit der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Alle für Versuche in dieser Studie genutzten Tiere waren Mäuse mit einem ApolipoproteinE-Knockout (ApoE^{-/-}).

4.1.2 Etablierung der Futterdosis

Zum Zeitpunkt des Versuchs existierte in der Literatur nur für die Behandlung von Mäusen mit Warfarin + Vitamin K1 eine Futterdosis von 3 g Warfarin / kg Futter mit 1,5 g Vitamin K1 / kg Futter, die sich bereits in mehreren Versuchen bewährt hatte (KRUGER et al., 2013; RATTAZZI et al., 2018).

Im Gegensatz dazu war bis zu dieser Studie nur eine LD50-Dosis als Einmalgabe für Warfarin und Edoxaban bei Tieren bekannt. Da jedoch noch keine therapeutische Langzeitdosis von Antikoagulantien für Mäuse etabliert war, wurde nach aktueller Literatur und Wissensstand eine für die Tiere anhand von Gewicht und täglicher Futtermenge passende Dosis berechnet. Aus vorangegangenen Versuchen an Mäusen war durch regelmäßige Gewichtskontrollen bereits ein Durchschnittsgewicht von ca. 25 g bekannt. Bei einer durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme von 4 g konnte errechnet werden, wie viel mg Substanz pro kg Maus täglich aufgenommen werden. Da beim Menschen die tägliche Einnahmemenge durch festgelegte Substanzmengen pro Tablette bekannt ist, konnte diese bei einem Durchschnittsgewicht der Menschen auf die Maus umgerechnet und als Maßstab genutzt werden. Damit die Mäuse eine von den Inhaltsstoffen vergleichbare Nahrung wie Europäer und Amerikaner erhielten, wurde die sogenannte Western Type Diet (WTD) genutzt, welche sich durch einen hohen Fettanteil auszeichnet. Diese errechneten Dosen wurde dann in einer Pilotstudie in Form einer WTD den Mäusen über einen Zeitraum von sechs bis zehn Wochen verabreicht, um eine Langzeitverträglichkeit zu gewährleisten. Für die Kontrolle der getesteten Warfarindosis wurde im vier- bis sechswöchigem Abstand 100 µl Blut in ein Citratröhrchen entnommen mit unmittelbarer Bestimmung des INR-Wertes. Die Etablierung der passenden

Warfarindosis im Futter erfolgte mit einer rechnerisch untertherapeutischen Dosis, damit es zu keinen Komplikationen aufgrund einer zu hohen Warfarindosis mit daraus folgenden Blutungen kam. Die Dosissteigerung erfolgte abhängig von klinischer Verträglichkeit und gemessenen INR-Werten.

Bei der Etablierung einer geeigneten Edoxabandosis wurde wie bei Warfarin in regelmäßigen Abständen Blut entnommen und der Edoxabanspiegel bestimmt.

Für den Interventionsversuch wurden die Mäuse über einen Zeitraum von acht Wochen in folgende Versuchsarme aufgliedert: Alle Tiere erhielten eine WTD. Die erste Gruppe erhielt als Kontrollgruppe nur die WTD, die zweite zusätzlich 3000 mg / kg Futter Warfarin und 1500 mg / kg Futter Vitamin K1, die dritte Fettfutter mit 1,75 mg / kg Futter Warfarin und die vierte Fettfutter mit Edoxaban 375 mg / kg Futter. Dies bedeutet bei einem Durchschnittsgewicht von 25 g und einer Futteraufnahme von 4 g pro Tag eine tägliche Aufnahme von 1,5 mg Edoxaban pro Maus bzw. 60 mg Edoxaban / kg Körpergewicht (KG) 0,007 mg Warfarin pro Maus bzw. 0,28 mg / kg KG und 12 mg Warfarin und 6 mg Vitamin K1 bzw. 480 mg Warfarin / kg KG und 240 mg Vitamin K1 pro kg KG. Aufgrund eines Parasitenbefalles im Stall erhielten alle Mäuse zusätzlich das Antihelmintikum Fenbendazol in das Futter zugesetzt. Während der Versuche befanden sich maximal vier Tiere in einem Käfig, sie hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Futter. Nach einer Fütterungsdauer von sechs Wochen wurde bei allen Tieren eine Femoralarterienligatur (FAL) durchgeführt.

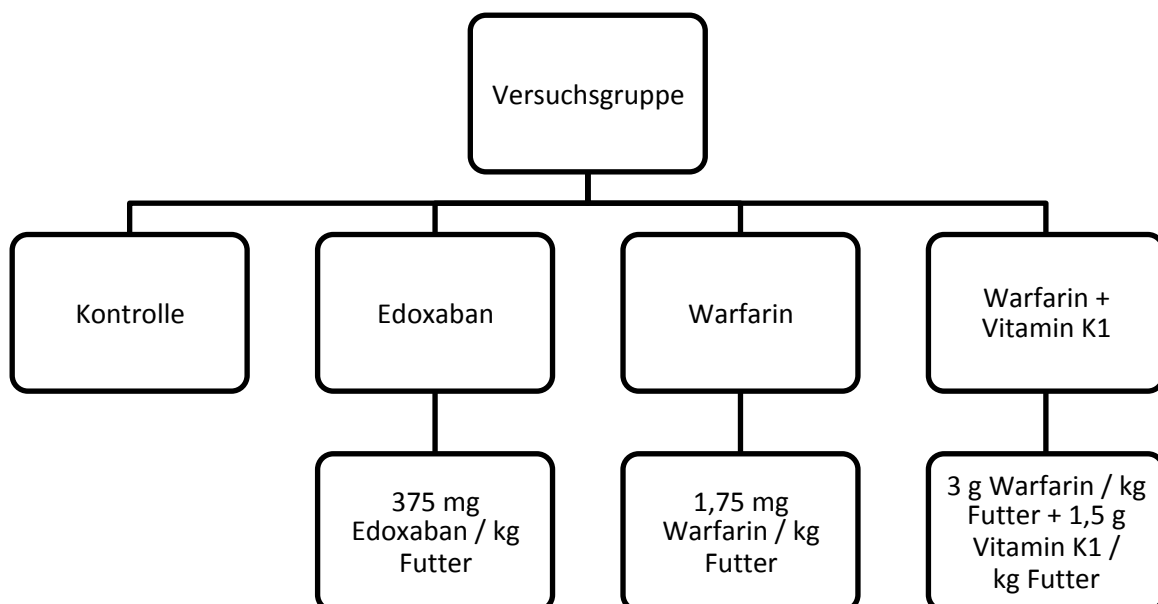


Abb. 1: Schematische Darstellung der vier Versuchsarme mit zugehöriger Medikamentendosis

4.1.3 Überwachung während der Dosisfindung

Während der Dosisfindung wurden die Mäuse entsprechend des im Tierversuchsantrages dargelegten Protokolls in regelmäßigen, engmaschigen Abständen kontrolliert. Dazu zählten u. a. Gewichtskontrollen und klinische Beurteilungen, um Unverträglichkeiten oder unerwünschte Reaktionen gegen das Futter oder andere Auffälligkeiten frühzeitig erkennen und darauf reagieren zu können.

4.1.4 Narkosen

Da für die Femoralarterienligatur und die Laser-Doppler-Perfusionsmessungen die Tiere über mehrere Minuten ruhig liegen mussten, wurde ihnen zur Analgosedierung Ketamin (100 mg / kg KG) und Xylazin (10 mg / kg KG) intraperitoneal verabreicht. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit Augensalbe (Bepanthen) zum Schutz der Cornea und der Einsatz einer Heizdecke, um eine Unterkühlung der operierten Tiere zu vermeiden und eine konstante Temperatur aufrecht zu erhalten.

4.1.5 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen zur Bestimmung des INR-Wertes bzw. des Edoxaban-Wirkstoffspiegels erfolgten durch eine Punktion der V. facialis. Die Abstände zwischen den Blutentnahmen betrugen vier bis fünf Wochen und wurden eng mit der Tierschutzbeauftragten koordiniert. Die Punktionen erfolgten mit einer 20G-Injektionskanüle 3 - 4 mm dorsokaudal des Haarwirbels im Bereich des Unterkiefers. Nach der Blutentnahme wurde die Einstichstelle komprimiert, damit es zu keiner Blutungskomplikation unter Antikoagulation kam.

4.1.6 Femoralarterienligatur

Nach erfolgreicher Narkotisierung erfolgte das Rasieren, Hautsterilisieren und Abdecken des Operationsgebietes. Zu Beginn der Operation wurde eine ca. 3 mm lange Hautinzision im Gebiet des medialen Oberschenkels über der Femoralarterie durchgeführt. Anschließend erfolgte ein stumpfes Freipräparieren des Gefäß-Nerven-Bündels und ein vorsichtiges Absetzen der Arterie von Vene und Nerv. Mit Hilfe eines nicht-resorbierbaren 6-0 Fadens wurde eine doppelte Ligatur der A. femoralis superficialis distal des Abganges der Arteria femoralis profunda angelegt. Die abschließende

Wundnaht erfolgte mit zwei bis drei Einzelknopfnähten mit einem 6-0 Faden. Die postoperative Schmerztherapie wurde mit Carprofen (5 mg / kg KG s.c.) schmerzadaptiert durchgeführt. Für die terminale Operation zur Organentnahme und Evaluation der Arteriogenese und Atherosklerose wurde den Tieren eine um den Faktor 10 erhöhte Menge von Ketamin und Xylazin verabreicht.

4.1.7 Laser-Doppler-Perfusionsmessungen

Die Laser-Doppler-Perfusionsmessungen wurden bei allen Mäusen durchgeführt, die nicht an den Dosisfindungsversuchen teilnahmen, um die Hinterlaufperfusion bei lebenden Tieren objektiv erfassen zu können. Die ersten beiden Messungen erfolgten während der Narkose kurz vor und nach der FAL. Weitere Messungen fanden am dritten, siebten und am finalen 14. postoperativen Tag statt, jeweils in leichter Sedierung zur Vermeidung von Bewegungsartefakten. Die Messungen fanden auf einer beheizten Schaumstoffunterlage statt. Zur Vorbereitung wurden die Tiere in Bauchlage gelegt und die beiden Hüftgelenke nach medial und kaudal bewegt, damit die Hinterläufe gestreckt, proniert und nah zueinander positioniert werden konnten.

Die Messung selbst erfolgte mit einem Laserstrahl der Wellenlänge von 830 nm (infrarot), der ein ca. 9 cm² großes Areal systematisch und schichtweise abtastete bei einer Auflösungsgrenze von 100 µm. Um die Durchblutung der beiden Hinterläufe zu messen, wurde der sogenannte Doppler-Effekt genutzt, der u. a. besagt, dass die ausgesandten und reflektierten Lichtwellen ihre Frequenz erhöhen, wenn Blut in Richtung der Lichtwelle fließt. Somit konnte nach einer graphischen Umwandlung des Signals in eine farbkodierte Karte von dunkelblau bis hellrot, ähnlich einer Wärmebildkamera, diese mittels einer Computersoftware daraufhin untersucht werden, ob sich die Durchblutung im ligierten Hinterlauf vom unbehandelten Hinterlauf unterscheidet.

Diese Methode lässt sich besonders bei Mäusen zur Messung der Durchblutung einsetzen, da die Pfoten der Tiere unbehaart sind, somit direkt auf der Haut gemessen werden kann und das Signal nicht durch Behaarung o. ä. gestört wird. Eine länger andauernde, reaktive Hyperämie des zu messenden Areals nach einer Manipulation, z. B. durch Rasieren oder Epilieren, konnte so vermieden werden. Da die Pfoten der Tiere zudem sehr dünn sind und der Laserstrahl diese komplett durchdringt, konnte diese Methode ohne Verzerrung eingesetzt werden. Der oft geäußerte Kritikpunkt, dass dieses Untersuchungsverfahren physikalisch bedingt nur eine Eindringtiefe von 1 - 2 mm hat und somit oft nicht die komplette Extremität gemessen wird, war in diesem Versuch also nicht relevant.



Abb. 2: Laser-Doppler-Perfusionsmessung

(a) Zur Rechten des Bildes ist der Laser-Doppler-Imager zu sehen, welcher an der blauen, höhenverstellbaren Metallhalterung verankert ist. Direkt unter dem LDI wird bei den Versuchen die narkotisierte Maus auf eine schwarze, beheizte Schaumstoffunterlage gelegt und die Messung durchgeführt. Direkt hinter dem Laptop ist das Kontrollgerät zu erkennen, welches als Schnittstelle zwischen dem LDI und dem Laptop dient. Der Laptop führt eine Umwandlung des Signals in eine Graphik mit verschiedenen Farbtönen analog ihrer Durchblutung (blau = keine Durchblutung, rot = starke Durchblutung) durch. (b) Die Maus wurde in Bauchlage und ihre Hinterläufe so positioniert, dass die Plantarseite der Pfoten in Richtung des Lasers zeigten.

4.1.8 Tötung und Organentnahme

Die Tötung der Mäuse erfolgte immer in tiefer Narkose durch eine zehnfach erhöhte Applikation von Ketamin und Xylazin.

Bei den Versuchstieren, die für die Dosisfindung eingesetzt wurden, wurde post mortem eine mediane Laparotomie durchgeführt, um aus der Aorta abdominalis ausreichend Blut für eine Messung des INR-Wertes bzw. des Edoxabanspiegels zu bekommen.

Bei den Versuchstieren, die einer FAL unterzogen wurden, wurde vor der Tötung eine Laser-Doppler-Perfusionsmessung in leichter Narkose durchgeführt, anschließend erfolgte die erhöhte Applikation von Ketamin und Xylazin und eine mediane Laparotomie mit Entnahme der beiden Nieren, der Milz, der Aorta abdominalis und von Blut. Das Herz wurde nach einer medianen Thorakotomie entnommen.

Um das adaptive und maladaptive Gefäßremodeling untersuchen zu können, wurden bei allen Versuchstieren mit FAL jeweils beidseits die Mm. adductores und Mm. peronei entnommen. Für die

Entnahme des M. adductor erfolgte nach dem Entfernen des Fells ein Längsschnitt vom Hüftgelenk bis kurz distal des Kniegelenks, um den Muskel vollständig mitsamt der Knochen seines Ursprungs am Os pubis und Os ischii und Ansatzes am Epicondylus medialis des Femurs darstellen und als Ganzes gewinnen zu können. Die Entnahme der Mm. peronei wurde durch eine Verlängerung des Schnitts bis zu den Pfoten des Tieres zur kompletten Darstellung des Muskels und der Fibula ermöglicht. Zur Quantifizierung der Atherosklerose und der Fibrose in Gefäßen wurden zusätzlich die Herzen mit Aortenbogen entnommen.

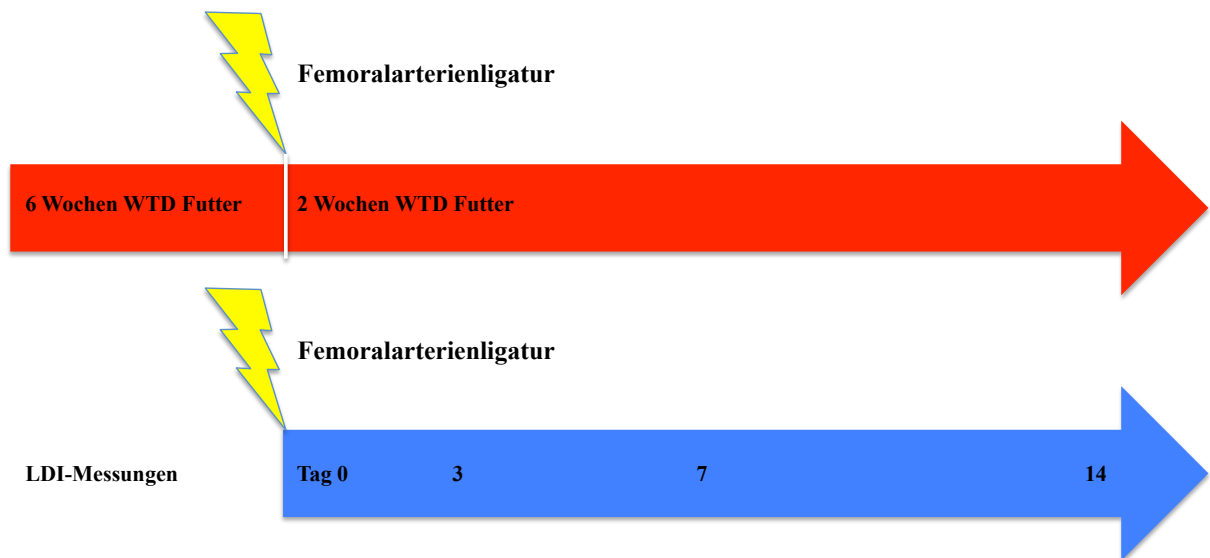


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Die Mäuse wurden über insgesamt acht Wochen mit WTD-Futter gefüttert, dem ggf. Edoxaban, Warfarin oder Warfarin + Vitamin K1 beigemischt wurde. Nach sechs Wochen erfolgten LDI-Messungen unmittelbar vor und nach der FAL sowie nach drei und sieben Tagen und am finalen 14. Tag nach FAL.

4.2 Histologie

4.2.1 Allgemeines und Probengewinnung

Unmittelbar nach der Entnahme der Herzen wurden diese in ein Reagiergefäß überführt, temporär mittels Trockeneis gekühlt und anschließend bei - 80 °C gelagert. Zum Anfertigen der Kryoschnitte wurden die Herzen aus den Gefäßen entnommen und die Aortenbögen mit einer feinen Kanüle durchstoßen, um die Herzklappenebene genau positionieren zu können. Anschließend wurden die Kanülen auf den Rand eines kreisrunden, nach oben hin offenen Gefäßes aus Aluminiumfolie gelegt und dieses anschließend langsam mit dem flüssigen Tissue-Tek-Eindeckmedium gefüllt. Hierbei war es essentiell, dass sich die Ebene der zu untersuchenden Aortenklappe immer waagrecht zum Boden befand, damit die Klappe später komplett und gerade angeschnitten werden konnte. Nachdem die Gefäße ausreichend gefüllt waren, erfolgte zum Aushärten des Tissue-Tek-Gels eine Lagerung bei - 80 °C.

Für eine bessere Schnittfähigkeit des Gewebes wurden diese Blöcke eine Stunde vor dem Schneidevorgang bei - 20 °C gelagert. Um für eine spätere Färbung ausreichend dünne Schnitte zu erhalten, wurde das eingebettete Gewebe in einem Kryotom in ca. 5 - 7 µm dicke Scheiben geschnitten und diese auf einem Objektträger aufgefangen. Nach jeweils drei Schnitten wurden diese mikroskopisch auf die richtige Position hin begutachtet, ggf. wurde das Präparat verworfen und eine tiefere Schicht aufgesucht. Pro Herz wurden 30 Schnitte angefertigt.

Auch die Mm. adductores wurden nach der Entnahme in ein Reagiergefäß überführt und anschließend auf - 80 °C heruntergekühlt. Da die Adduktoren immunhistochemisch gefärbt wurden, die in diesem Versuch genutzten Färbungen mit dem bereits beschriebenen Tissue-Tek-Eindeckmedium und der Kryoschnittmethode wegen einer schlechteren Erhaltung der Strukturen unterlegen waren, erfolgte die Einbettung in Paraffin. Hierzu wurde das Gewebe zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und bis zu seiner endgültigen Einbettung in Xylol zwischengelagert, bevor es schließlich in ca. 60 °C heißes, flüssiges Paraffin eingebracht wurde. Anschließend wurde es in Blöcke gegossen und bis zum nächsten Tag abgekühlt. Zum Schneiden der Blöcke wurde ein Mikrotom benutzt, welches bis zu 0,5 µm dünne Scheiben ermöglicht. Im vorliegenden Fall wurden ca. 1 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf spezielle Objektträger aufgebracht wurden. Um möglichst den ganzen Muskel beurteilen zu können, wurde zwischen jedem Schnitt ein Abstand von 50 µm eingehalten. Bei der anschließend durchgeführten Immunhistochemie konnten Rückschlüsse auf die Anwesenheit bestimmter Zelltypen gezogen werden.

4.2.2 Ölrot-Färbung

Oil Red O (Ölrot) ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, der rötlich färbt. Er wird v. a. zur Färbung von Lipiden, insbesondere von Triglyceriden, eingesetzt. In diesem Versuch wurde die Färbemethode zur Darstellung von atherosklerotischen Plaques im Bereich der Aortenklappen eingesetzt, um die Fläche in Zusammenhang zur Gesamtfläche des Lumens der Aorta zu setzen. Damit konnte die atherosklerotische Okklusion der Gefäße zwischen den verschiedenen Versuchsarmen verglichen werden.

Zu Beginn wurden die gefrorenen Objektträger bei Raumtemperatur zur Fixierung der Zellen in eine 4-prozentige Formalinlösung gelegt. Nach einer Spülung mit Aqua dest. erfolgte die eigentliche Färbung in einer Ölrot-Gebrauchslösung für mindestens eine Stunde. Anschließend wurden die Objektträger nach einer kurzen Spülung in einer Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt, um die Zellkerne anzufärben. Als letzter Schritt wurden die Präparate für eine bessere Haltbarkeit mit Aquatex und einem Deckglas eingedeckt.

4.2.3 Sirius-Red-Färbung

Picro-Sirius-Red (kurz: Sirius-Red) ist ein linearer, stark anionischer Farbstoff, der an Sulfonatgruppen in kationischen Kollagenfäden bindet und sie so darstellen kann. Im Versuch wurde diese Färbemethode zur Darstellung von fibrotischen Prozessen im Bereich der Aortenklappe eingesetzt, um sie zu fotografieren und anschließend mittels einer computergestützten Auswertung das Ausmaß der Fibrose der Aortenklappen und -wände zu beurteilen.

Zu Beginn wurden die Objektträger in eine absteigende Alkoholreihe mit 100-, 90- und 70-prozentigem Ethanol gelegt. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua dest. erfolgte die eigentliche Färbung mit einer 0,1-prozentigen Sirius-Red-Lösung. Nach einer weiteren Spülung mit Aqua dest. erfolgte das Legen in eine aufsteigende Alkoholreihe mit 90- und 100-prozentigem Ethanol und dem hydrophoben Lösungsmittel Xylol, bevor die Präparate mit Entellan eingedeckt wurden.

4.2.4 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie nutzt spezifische Antikörper gegen Proteine oder andere Strukturen, um diese sichtbar zu machen; man kann von einer klassischen Antigen-Antikörper-Reaktion sprechen. Normalerweise bindet ein Primärantikörper mit seinem Fab-Fragment an das Epitop des gesuchten Antigens, welches für den Versuch dargestellt werden soll. Wenn dieser Primärantikörper nicht selbst fluoreszieren kann, wird ein fluoreszierender Sekundärantikörper hinzugegeben, der wiederum mit seinem Fab-Fragment an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet. Anschließend werden die Präparate gespült, somit verbleiben nur Antikörper auf dem Schnitt, die auch an ihr spezifisches Antigen gebunden haben. Bei Bestrahlung der Schnitte mit Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert der Primär- bzw. Sekundärantikörper. Dadurch können die gesuchten Proteine indirekt dargestellt und quantifiziert werden.

Bevor die Antikörper auf die Objektträger mit den Präparaten aufgetragen werden konnten, mussten diese zunächst vorbereitet werden. Zuerst erfolgte das Entparaffinieren durch ein 30-minütiges „Anbacken“ bei 60 °C, das Legen in das organische Lösungsmittel Xylol und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe, bestehend aus 100-, 80- und 70-prozentigem Ethanol und Waschen in PBS. Anschließend wurden die Präparate demaskiert, indem sie für eine Stunde bei 98 °C in einer frisch angesetzten und auf pH 7,4 titrierten Citraconsäurelösung gekocht wurden. Nach einem 20-minütigen Abkühlvorgang erfolgte ein Waschen in PBS und das Umranden mit einem Fettstift, damit die aufgetragenen Antikörper später nicht verlaufen konnten.

4.2.5 Anti-CD68-Färbung

CD68 (auch Macrosialin genannt) ist ein Oberflächenprotein und Zelladhäsionsmolekül, welches stark v. a. von zirkulierenden sowie Gewebemakrophagen exprimiert wird. Wie bereits weiter oben erwähnt, spielen diese Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose (Schaumzellen), weshalb dieser Antikörper als Indikator für atherosklerotische Prozesse herangezogen wurde.

Der Antikörper wurde direkt nach der oben beschriebenen Vorbereitung der Objektträger auf die Schnitte in einer 1:30-fachen Verdünnung aufgebracht und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Inkubation für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad in einer feuchten Kammer, bevor die Objektträger mit PBS gewaschen und abgetropft wurden. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Anti-Rat-IgG-TRITC in einer 50-fachen

Verdünnung aufgebracht, wieder bei 37 °C in einer feuchten Kammer im Wasserbad für eine Stunde inkubiert und schließlich wieder in PBS gewaschen.

Im Anschluss wurden die gleichen Präparate mit der unten beschriebenen Anti- α -smooth-muscle-actin-Färbung gefärbt und eingedeckt.

4.2.6 Anti- α -smooth-muscle-actin-Färbung

Diese Färbung wurde dazu genutzt, die glatten Muskelzellen der Tunica media von Arterien darzustellen, sie konnte Auskunft über das Vorhandensein von alten bzw. neuen, kleinen Kollateralarterien und deren Gefäßdicke geben.

Im Gegensatz zum CD68-Antikörper musste kein Sekundärantikörper hinzugegeben werden, da dieser bereits FITC markiert war. Deshalb musste der Antikörper nur einmal 1:50 mit PBS verdünnt und nach dem Auftragen einmalig für drei Stunden bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert werden. Nach einem abschließenden Waschen mit PBS konnten die Objektträger schließlich mit Mounting Medium und DAPI eingedeckt werden.

4.3 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

4.3.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Für die RNA-Extraktion wurde ca. ein Drittel der Adduktoren bzw. der Milz in ein Gefäß mit 1 ml TRIFAST gegeben und anschließend homogenisiert, wobei wegen der entstehenden Reibungswärme durch den rotierenden Metallstab besonders vorsichtig gearbeitet werden musste, um eine Überhitzung und damit Zerstörung der RNA zu vermeiden. Nach einer fünfminütigen Pause wurden 200 µl Chloroform zum Zellgemisch pipettiert und dieses anschließend mittels Vortexmixer gemischt und für zehn Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C bei 12000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert, die entstehende oberste Phase (ca. 500 µl) vorsichtig in ein mit 500 µl - 20 °C kaltem Isopropanol gefüllten neuen Reagenzgefäß abpipettiert und über Nacht bei - 20 °C in den Eisschrank zum Ausfällen gestellt. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 4 °C bei 12000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert und der entstehende Überstand vorsichtig abgesaugt und verworfen. Zu dem verbleibenden Rest am Boden des Gefäßes wurde 1 ml 70-prozentiges Ethanol (- 20 °C) gegeben und dann wiederum bei 4 °C und 12.000 rpm 20 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol vorsichtig komplett abgesaugt und das verbleibende RNA-Pellet für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit 30 µl DNase-freiem Aqua dest. resuspendiert und für zehn Minuten bei 60 °C inkubiert. Zur Messung der RNA-Konzentration des Gemischs wurden 1,5 µl am Nanodrop gemessen und der verbleibende Rest der RNA bei - 80 °C bis zu den weiteren Versuchen gefroren gelagert.

4.3.2 Umwandlung der RNA in cDNA

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde das „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ genutzt. Durch die bereits erfolgte Messung des RNA-Gehalts der Lösungen am Nanodrop wurde errechnet, wie viele µl Lösung gebraucht werden, um 2 µg reine RNA zu erhalten. Die zu 10 µl Lösung fehlende Menge wurde mit RNase-free H₂O in einem neuen Reagenzglas aufgefüllt (z. B. waren 2 µg RNA in 3,5 µl Lösung enthalten, folglich mussten noch 6,5 µl H₂O hinzugefügt werden, um 10µl 20-prozentige RNA-Lösung zu erhalten). Anschließend wurde der Master-Mix angesetzt, der pro 10 µl aus 2 µl RT-Buffer, 0,8 µl dNTP Mix, 2 µl RT Random Primers, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µl RNase Inhibitor und 3,2 µl RNase-free H₂O bestand. Zu jeder Probe wurden 10 µl Master-Mix hinzugefügt und direkt danach kurz vermischt und für zehn Sekunden auf 6000 rpm

zentrifugiert. Die bereits fertigen Proben wurden bis zum Umschreiben in der PCR auf Eis gekühlt, um eine vorzeitige Reaktion der Reagenzien mit der RNA der ersten Proben zu verhindern.

4.3.3 Amplifikation der cDNA

Die PCR ist ein sowohl in der Forschung, als auch im klinischen Alltag sehr häufig genutztes Verfahren, um in relativ kurzer Zeit auch sehr kleine Mengen an RNA oder DNA durch eine enzymatische Reaktion zu vervielfältigen und zu quantifizieren.

Die PCR besteht aus mehreren Zyklen, bestehend aus jeweils drei Phasen, dem Trennen der Stränge (Denaturierung), der Hybridisierung (Annealing) und der Kettenverlängerung (Elongation). Während des ersten Schrittes der PCR, der Denaturierung, wird die DNA bei 95 °C in ihre beiden zueinander komplementären Einzelstränge geteilt. Beim anschließenden Annealing wird die Temperatur auf ca. 60 °C gesenkt, um ein optimales Anlagern der Primer an die DNA-Einzelstränge zu ermöglichen. Ist dieser Vorgang abgeschlossen, wird die Temperatur wieder auf ca. 70 °C erhöht, um die letzte Phase des Zyklus, die Elongation zu starten. Sie erfolgt mit Hilfe einer Taq-Polymerase, die sich durch eine gute Hitzestabilität auszeichnet. Diese bindet an das 3' Ende des bereits angelagerten Primers und beginnt dann mit der Synthese des komplementären DNA-Strangs aus den zugegebenen Nucleotiden. Dieser Zyklus wurde 40 Mal wiederholt, damit eine für eine aussagekräftige Messung ausreichende Menge an DNA erzeugt werden konnte.

Für die PCR wurden die Proben der DNA nochmals in neue Gefäße überführt und anschließend erneut um den Faktor 10 verdünnt, so dass nun eine Verdünnung von 1:100 vorlag. Um die qRT-PCR später auswerten zu können, wurde eine fünfmal um den Faktor 1:2 verdünnte Standardreihe aus der bereits 1:10 verdünnten DNA (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) und eine um den Faktor 1:10 verdünnte Standardreihe (1:10, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$) hergestellt. In die 1:10 verdünnte Anfangsprobe wurden jeweils 10 µl aller 1:10 verdünnten cDNA-Proben gegeben. Weiterhin wurde in einem Reagenzglas eine Mischung aus dem PCR-Mastermix (pro Probe 7 µl) den forward- und reverse-Primern (jeweils 0,5 µl pro Probe) sowie RNase-free H₂O (9 µl pro Probe) vorbereitet. Als abschließenden Schritt vor der PCR wurden in die 96-Well-Plates zuerst die Standardreihen (3 µl) und eine Negativkontrolle (0 µl DNA) in einfacher Ausführung pipettiert. Anschließend wurden pro Probe zwei Wells mit jeweils 3 µl cDNA befüllt und abschließend in jedes Well 17 µl der bereits vorbereiteten Mischung aus Master-Mix und Primern hinzugefügt. Die Platte wurde mittels einer Folie luftdicht zugeklebt.

Unmittelbar vor der Messung wurden die 96-Well-Plates zur Vermeidung von Luftblasen innerhalb der Proben und zur Absetzung der cDNA auf den Boden der Wells bei 400 rpm für fünf Minuten zentrifugiert.

Die PCR-Geräte wurden auf eine Reaktionsdauer von zwei Stunden eingestellt, wobei nach jeder Elongation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wurde. Dabei wurden die Proben kontinuierlich erhitzt und die Fluoreszenz gemessen. Bei einer für das Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur wurden dabei die DNA-Stränge denaturiert, wodurch es zu einer Freisetzung des im Master-Mix enthaltenen SYBR-GREENs kam und dadurch eine Fluoreszenzabnahme detektiert werden konnte. Da die Probe im Vergleich zur Standardreihe ein anderes, charakteristisches Schmelz- und Fluoreszenzverhalten hatte, konnten hierdurch Rückschlüsse auf die Menge des gebildeten Fragments gezogen werden.

In diesem Fall wurde die Genexpression von Interleukin 6 (IL6), Tumor Nekrosefaktor Alpha (TNF alpha), Monocyte chemotactic protein 1 (MCP1) und Interleukin 1 beta (IL1b) gemessen und mit der des Housekeeper-Gens ribosomalen 18S verglichen, um eventuelle Unregelmäßigkeiten, z. B. durch Verunreinigungen der Proben, erkennen zu können, da 18S ein strukturell wichtiger Bestandteil der eukaryotischen zytoplasmatischen Ribosomen ist und von jeder Körperzelle gebildet wird. Durch 18S als Referenzgen ist es möglich, die Expression der anderen Gene zu interpretieren, da es unabhängig z. B. von medikamentösen Therapien relativ konstant exprimiert wird (KUCHIPUDI et al., 2012).

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung der langfristigen Antikoagulation bei Mäusen

Um eine zuverlässige Applikation zu erreichen, wurden die Medikamente mit der alltäglichen Nahrung (WTD) vermischt und den Tieren jederzeit zugänglich gemacht. An die Kontrollgruppe wurde ausschließlich WTD-Futter verfüttert. Die passende Edoxabandosis wurde in steigenden Dosen für jeweils mindestens vier Wochen unter regelmäßigen Gewichtskontrollen und klinischen Untersuchungen ermittelt. Nach dieser Zeit wurden Blutproben entnommen und in diesen die Konzentration des Edoxabans gemessen. Dabei konnte, trotz wiederholter Messungen bei 37,5 mg Edoxaban / kg Futter, kein Wirkstoffspiegel bestimmt werden, da dieser unterhalb der Nachweisgrenze war. Bei 375 mg Edoxaban / kg Futter konnten bei wiederholten Messungen ähnliche Werte deutlich oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden. Ergänzend wurde noch eine Dosierung von 750 mg Edoxaban / kg Futter getestet, welche von den behandelten Mäusen auch über einen längeren Zeitraum gut toleriert wurde. Diese Dosierung wurde jedoch nicht für den Versuch genutzt, da diese, im Vergleich zur humanen Dosierung, deutlich zu hoch gewesen wäre - somit hätten weniger Rückschlüsse auf Atherosklerose und Arteriogenese in therapeutischen Dosen gezogen werden können, da pro kg Maus eine zu hohe Dosis appliziert worden wäre.

Bei der Warfarindosis wurde nach einem ähnlichen Prinzip vorgegangen, beginnend bei 1 mg Warfarin / kg Futter, welche zwar von allen Mäusen vertragen wurde, jedoch keinen Einfluss auf den INR hatte. Die optimale Dosis wurde bei 1,75 mg Warfarin / kg Futter gefunden, da diese von den Mäusen ohne Komplikationen vertragen wurde und eine INR-Verschiebung in Richtung des therapeutischen Bereiches von 2 - 3 erfolgte. Bereits bei einer Erhöhung um 0,25 mg Warfarin / kg Futter (entspricht bei 4 g Futteraufnahme pro Tag einer absoluten Dosiserhöhung von 1 ng) auf 2 mg Warfarin / kg Futter starben innerhalb von 48 h nach Beginn der Fütterung bereits drei der vier Mäuse, so dass die 1,75 mg Dosierung die höchstmögliche, klinisch tolerierte Dosis darstellte. Während der Fütterung der Tiere für den Versuchsarm mit Femoralarterienligatur musste das Futter mit Fenbendazol versetzt werden. Dabei kam es, wahrscheinlich durch eine Interaktion von Fenbendazol und Warfarin bedingt, zu einer hohen Letalität der Mäuse innerhalb von 48 Stunden nach Fütterungsbeginn, so dass diese nicht an den weiteren Versuchen teilnehmen konnten und eine Auswertung dieser Versuchsgruppe unmöglich wurde. Die Untersuchung des Einflusses von Warfarin konnte somit nur in Kombination mit Vitamin K1 erfolgen.

Die Dosis des Warfarin + Vitamin K1-Futters wurde bereits von einer Arbeitsgruppe aus Aachen etabliert (KRUGER et al., 2013). Da diese jedoch mit Wild-Typ DBA/2 Mäusen arbeiteten, wurde die dort genutzte Dosis von 3 mg / kg Warfarin mit 1,5 mg / kg Vitamin K1 für mindestens sechs Wochen

mit dem in diesem Versuch genutzten Mäusestamm ApoE^{-/-} auf Verträglichkeit hin getestet. Dabei gab es während des gesamten Versuchs keinerlei Komplikationen.

5.2 Effekt von Antikoagulation auf die Perfusion und makroskopische Arteriogenese der hinteren Extremität

Die Messung der Perfusion der Hinterläufe der Mäuse erfolgte mit Hilfe des Moor LDI-Laser-Doppler-Imager. Dabei zeigte sich nach drei Tagen kein signifikanter Unterschied in der Perfusion der Hinterläufe. Auch nach sieben und 14 Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Perfusion detektiert werden ((Kontrolle $0,36 \pm 0,05$ vs. Warfarin + Vitamin K1 $0,39 \pm 0,09$ ($p=0,398$), Kontrolle vs. Edoxaban $0,51 \pm 0,06$ ($p=0,089$), Warfarin + Vitamin K1 vs. Edoxaban ($p=0,828$)). Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine Gabe von Edoxaban bzw. Warfarin + Vitamin K1 keinen messbaren Einfluss auf die Neubildung von Kollateralgefäßen im Versuchszeitraum von zwei Wochen hatte. Dieses Ergebnis wurde in den nachfolgend beschriebenen immunhistochemischen Färbungen weiter untersucht.

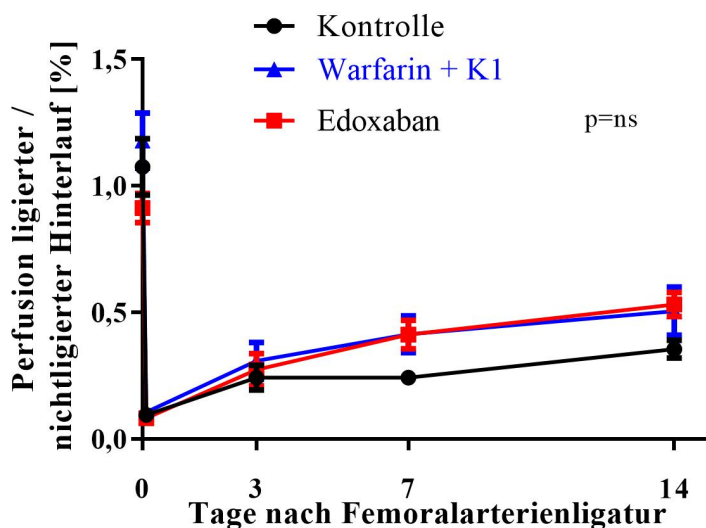


Abb. 4: Verlauf der Reperfusion des ligierten Hinterlaufs über 14 Tage

Dargestellt ist das Verhältnis der Perfusion des ligierten Hinterlaufs zur kontralateralen unbehandelten Seite. ($n[\text{Kontrolle}]=4$, $n[\text{Edoxaban}]=5$, $n[\text{Warfarin} + \text{K1}]=8$)

5.3 Einfluss von Antikoagulation auf Gefäßprozesse

5.3.1 Edoxaban vermindert die Fibrosierung von Gefäßwänden

Um das Maß der Fibrose detektieren und auswerten zu können, wurden Histologieschnitte der Adduktoren der Hinterläufe mit der Picosirius-Red-Färbung angefärbt. Mittels NIS-Software wurden die rotgefärbten Fibroseareale quantifiziert und ihr Anteil an der Gesamtfläche der Gefäßwand errechnet.

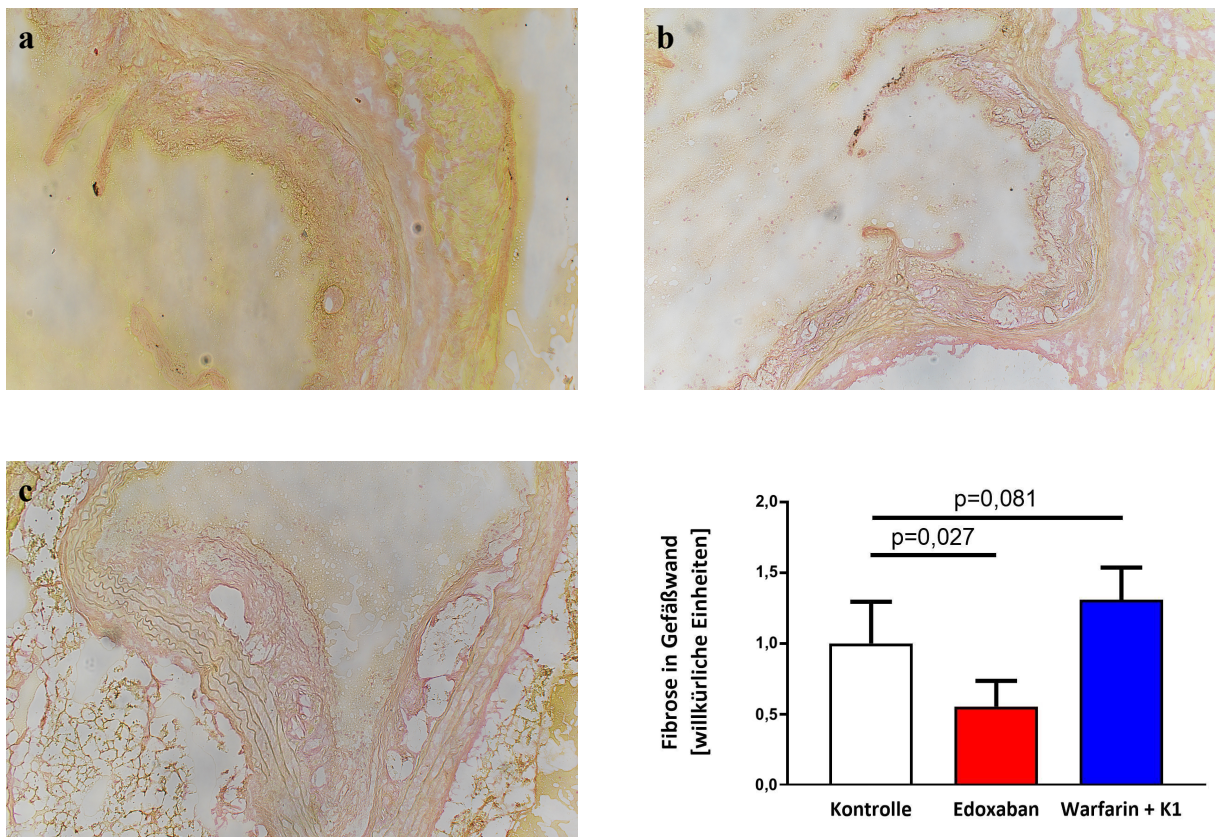


Abb. 5: Histologische Schnitte der Herzklappenebene, angefärbt mit Sirius-Red
Histologische Darstellung der Fibrosierung der Gefäßwände in der Herzklappenebene in der Kontrollgruppe (a), der Edoxabangruppe (b) und der Warfarin + K1-Gruppe (c). Zu erkennen ist eine vermehrte Fibrosierung in der Kontrollgruppe und der Warfarin + K1-Gruppe im Vergleich zur Edoxabangruppe.

Im Diagramm ist die Fibrosierung der Gefäßwände nach achtwöchiger Behandlung mit WTD-Futter und Edoxaban und Warfarin + K1 dargestellt. ($n[\text{Kontrolle}]=4$, $n[\text{Edoxaban}]=5$, $n[\text{Warfarin} + \text{K1}]=8$)

Nach der achtwöchigen Behandlung der Mäuse mit Antikoagulantien zeigten sich signifikante Unterschiede in der Fibrosierung der Gefäße. In der Edoxaban-Gruppe waren $1,7 \pm 0,6\%$ der Gefäßfläche positiv für Fibrose, verglichen mit $4,1 \pm 0,7\%$ in der Warfarin + Vitamin K1-Gruppe und

3,1±0,9% in der Kontrollgruppe ohne Antikoagulation (Ko 3,1±0,9% vs. Edo 1,7±0,6% (p=0,027), Ko vs. Warf 4,1±0,7% (p=0,081), Edo vs. Warf (p<0,001)).

5.3.2 Edoxaban vermindert die atherosklerotische Plaquebildung

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Plaquebildung wurden die Histologieschnitte mit Ölröt angefärbt. Mittels NIS-Software wurde die Plaquefläche ins Verhältnis zur Gesamtfläche des Gefäßlumens gesetzt. Unter einer fetthaltigen WTD entwickelten sich unter Antikoagulation mit Edoxaban mit 38±12% plaquefreier Fläche kleinere intravasale Plaques als in der Warfarin + Vitamin K1-Gruppe mit 31±14% und der Kontrollgruppe mit 26±11% plaquefreier Fläche (Ko 26±11% vs. Edo 38±12% (p=0,024), Ko vs. Warf 31±14% (p=0,300), Edo vs. Warf (p=0,144)).

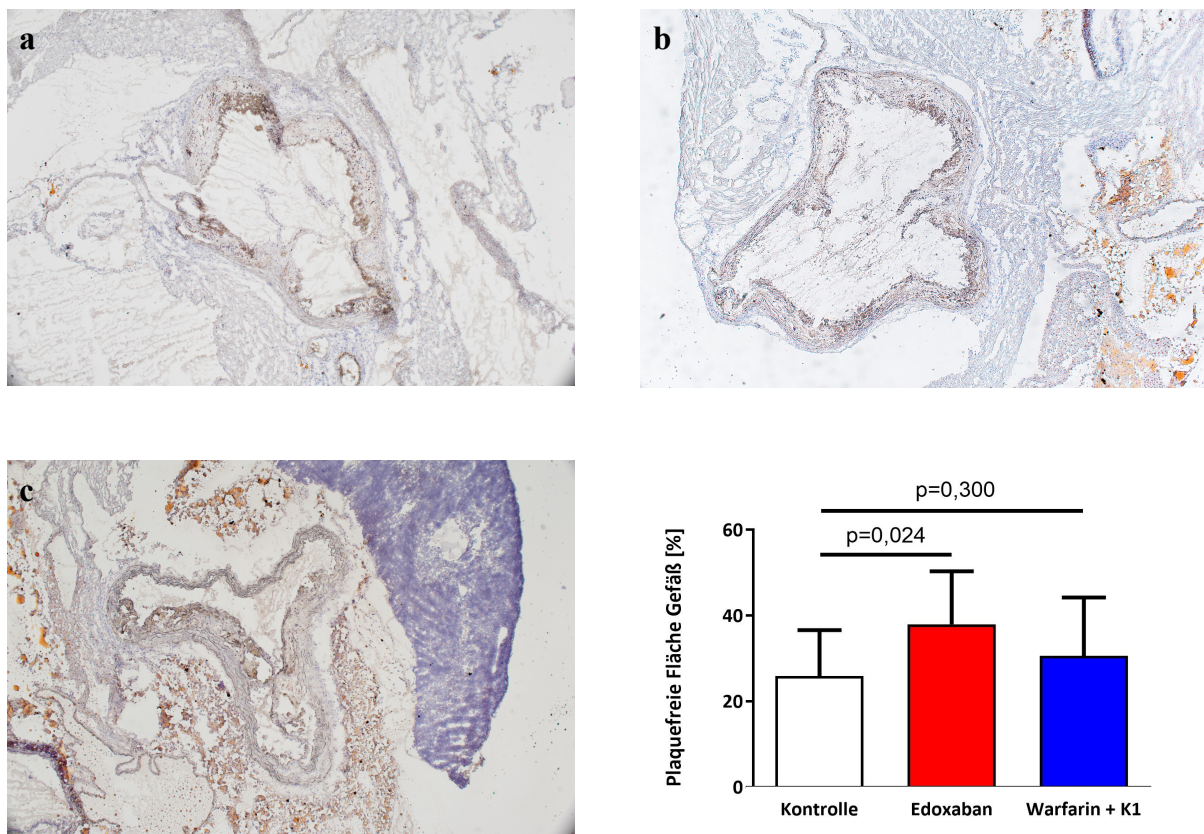


Abb. 6: Histologische Schnitte der Herzklappenebene, angefärbt mit Ölröt
 Histologische Darstellung atherosklerotischer Plaques in der Herzklappenebene in der Kontrollgruppe (a), der Edoxabangruppe (b) und der Warfarin + K1-Gruppe (c). Zu erkennen ist eine größere Plaquefläche in der Kontrollgruppe und der Warfarin + K1-Gruppe im Vergleich zur Edoxabangruppe.

Im Diagramm sind die plaquefreien Flächen der Gefäße nach achtwöchiger Behandlung mit WTD-Futter und Edoxaban und Warfarin + K1 dargestellt. (n[Kontrolle]=4, n[Edoxaban]=5, n[Warfarin + K1]=8)

5.3.3 Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die mikroskopisch detektierbare Arteriogenese

Zur immunhistochemischen Darstellung der Arteriogenese wurden die glatten Muskelzellen der Gefäße mittels α SMC-Antikörper dargestellt und quantifiziert.

Es zeigte sich kein signifikanter ($p > 0,05$) Unterschied in der Arteriogenese von Edoxaban ($3,96 \pm 0,79$) verglichen mit der Kontrollgruppe ($4,25 \pm 0,24$). Mit Warfarin + Vitamin K1 behandelte Mäuse ($3,34 \pm 0,32$) zeigten einen Trend in Richtung weniger SMCs als in den beiden anderen Gruppen, der mit $p > 0,05$ jedoch nicht signifikant war.

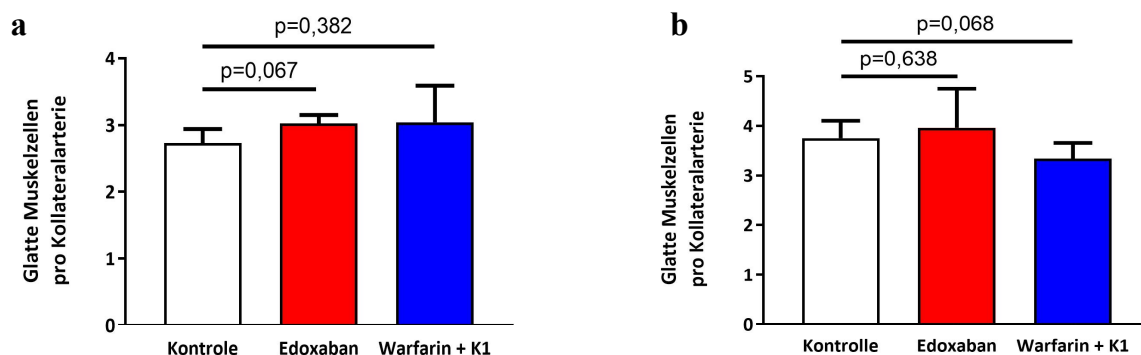


Abb. 7: Histologische Darstellung glatter Muskelzellen in Gefäßwänden

Die Anzahl der gemessenen SMCs kann als Maß für die Ausbildung neuer Gefäße genutzt werden. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Bei den linken Adduktoren (a) erfolgte keine FAL, bei den rechten Adduktoren (b) erfolgte eine FAL. ($n[\text{Kontrolle}] = 4$, $n[\text{Edoxaban}] = 5$, $n[\text{Warfarin} + \text{K1}] = 8$)

5.3.4 Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die Genexpression von CD68

Zur Darstellung der Genexpression des Makrophagen-Markers CD68 wurden die Schnitte mit CD68-Antikörpern gefärbt. Mittels ImageJ wurde die Makrophagenfläche / Gefäßanzahl semiquantitativ dargestellt.

Es zeigte sich ein Trend der Edoxaban-Gruppe ($1,48 \pm 0,13$) und Warfarin + Vitamin K1-Gruppe ($1,31 \pm 0,16$) zu einer perikollateralen Makrophagenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,73 \pm 0,33$), welcher jedoch mit $p > 0,05$ nicht signifikant war.

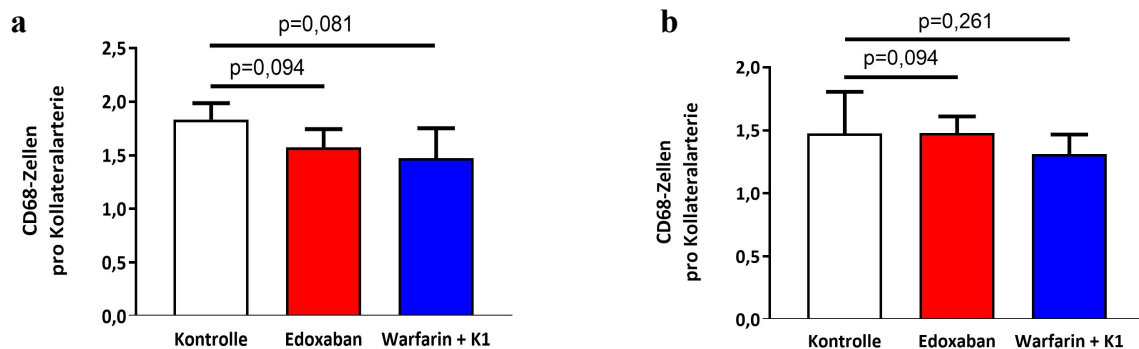


Abb. 8: Histologische Darstellung perivaskulärer CD68-positiver Makrophagen
Die Anzahl der gemessenen CD68-positiven Makrophagen kann als Maß für ein proinflammatorisches Milieu im Bereich der Gefäße genutzt werden. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Bei den linken Adduktoren (a) erfolgte keine FAL, bei den rechten Adduktoren (b) erfolgte eine FAL. ($n[\text{Kontrolle}] = 4$, $n[\text{Edoxaban}] = 5$, $n[\text{Warfarin} + \text{K1}] = 8$)

5.4 Einfluss von Antikoagulation auf die Genexpression inflammatorischer Zytokine

5.4.1 Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die Genexpression in Milzzellen

Zur Untersuchung eines proinflammatorischen Milieus wurde mit Hilfe einer RT-PCR die Genexpression der Zytokine IL6, MCP1, TNFalpha und IL1b gemessen.

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der mRNA zwischen den Versuchsgruppen.

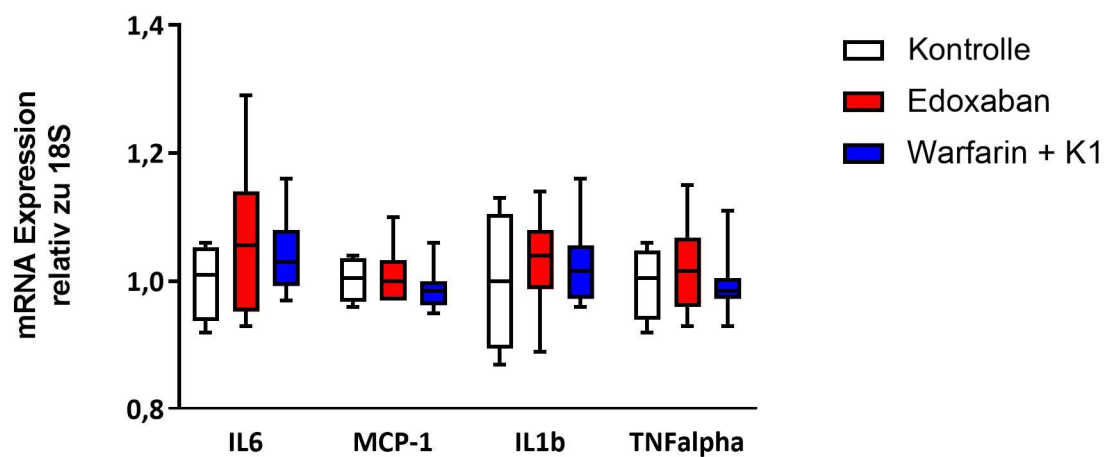


Abb. 9: Relative mRNA Expression für Gene inflammatorischer Zytokine im Vergleich zum Housekeeper-Gen 18S in Milzzellen

($n[\text{Kontrolle}]=4$, $n[\text{Edoxaban}]=5$, $n[\text{Warfarin} + K1]=8$)

5.4.2 Antikoagulation hat keinen Einfluss auf die proinflammatorische Genexpression in Addukturen

Zur Untersuchung des inflammatorischen Milieus wurde mit Hilfe einer RT-PCR die Genexpression der Zytokine IL6, MCP1, TNFalpha und IL1b gemessen.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression der o. g. Zytokine in den verschiedenen Gruppen. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei der nicht ligierten kontralateralen Seite.

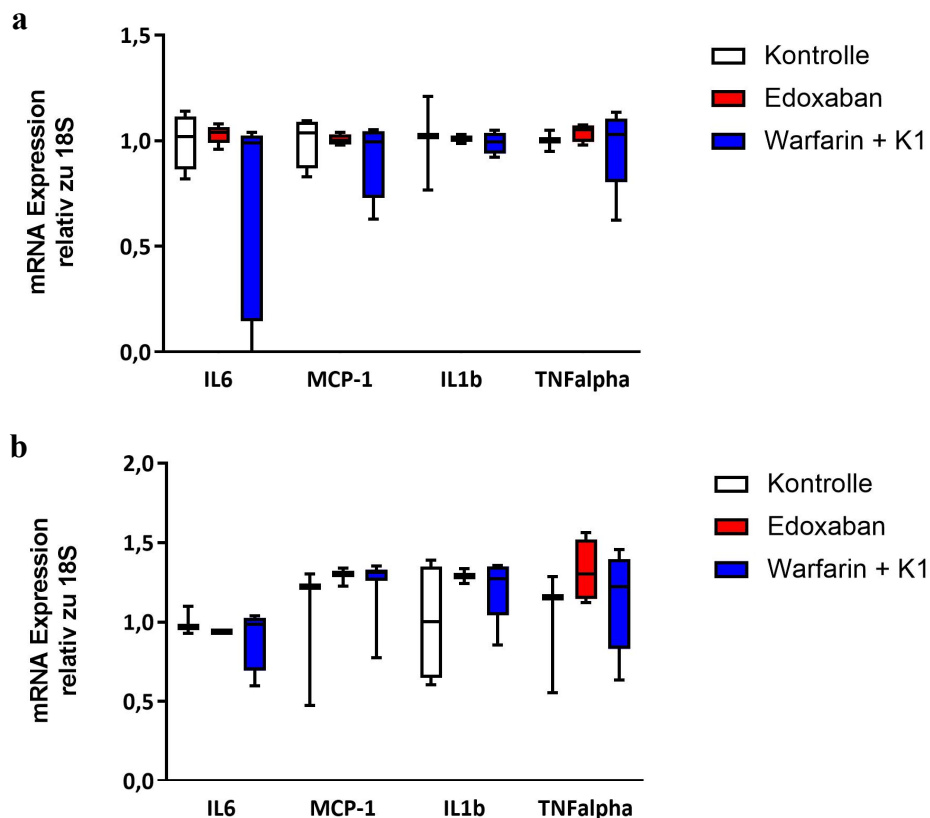


Abb. 10: Relative mRNA Expression für Gene inflammatorischer Zytokine im Vergleich zum Housekeeper-Gen 18S in Muskelzellen der Addukturen

Bei den linken Addukturen (a) erfolgte keine FAL, bei den rechten Addukturen (b) erfolgte eine FAL. ($n[\text{Kontrolle}]=4$, $n[\text{Edoxaban}]=5$, $n[\text{Warfarin} + K1]=8$)

6 Diskussion

In dieser Studie konnte der präventive Effekt des Faktor-Xa-Hemmers Edoxaban auf die Fibrosierung und die Atherosklerose im Vergleich zum VKA Warfarin im ApoE-Mausmodell gezeigt werden.

Um den Einfluss von Antikoagulantien auf Gefäßprozesse untersuchen zu können, musste eine möglichst therapeutische, aber zugleich verträgliche Antikoagulation genutzt werden. Bislang waren für Nagetiere nur LD50-Daten und kurzzeitige Versuche für Edoxaban (DAIICHI SANKYO CO., 2014) und Warfarin (OCCUPATIONAL HEALTH SERVICES, 1994) bekannt, weshalb im Rahmen dieser Studie zunächst eine zuverlässige längerfristige Dosis von Edoxaban und Warfarin bei Mäusen etabliert werden musste. Da in den Zulassungsstudien für Edoxaban nur Ratten, Hasen und Affen, jedoch keine Mäuse genutzt wurden (FURUGOHRI et al., 2008), bestand zum Versuchszeitpunkt kein bekanntes Schema zur langfristigen Antikoagulation von Mäusen. Als mögliche Applikationsformen wurden verschiedene Methoden diskutiert, darunter die tägliche subkutane Spritze und die Anreicherung des Trinkwassers der Mäuse mit den Medikamenten. Die subkutane Applikation hätte jedoch täglich erfolgen müssen und hätte für die Mäuse zu viel Stress bedeutet und die Gabe der Substanzen über das Trinkwasser wäre auf Grund der Lipophilie der Substanzen nur eingeschränkt möglich. Da das Futter den Vorteil hatte, dass sowohl Warfarin, als auch Edoxaban in beliebig hohen Dosen mit dem Futter vermischt werden konnte, wurde diese Methode genutzt. Weiterhin ist bekannt, dass das Fettfutter in den Mäusen Übergewicht verursacht und inflammatorische Prozesse fördert (FERRANTE, 2007), welche für diese Studie essentiell sind. Für eine Applikation von Warfarin mit Vitamin K1 wurde bereits ein mehrwöchiges Behandlungsschema etabliert (KRUGER et al., 2013; RATTAZZI et al., 2018), jedoch wurden in einem Versuch DBA/2 Mäuse genutzt, welche ein Knockout für andere Gene besaßen und weniger sensitiv auf fetthaltiges Futter reagierten. Aus diesem Grund wurde für die durch den Knockout des ApoE-Gens besonders schnell Atherosklerose entwickelnden Mäuse mit vermindertem Fettstoffwechsel die damals genutzte Dosis für mehrere Wochen auf Verträglichkeit hin getestet. Die o. g. Gruppe war gut geeignet, die Einflüsse des Warfarins abseits der Antikoagulation zu untersuchen, da durch die gleichzeitige Applikation von Vitamin K1 die Antikoagulation inhibiert wurde und dadurch zu normalen Gerinnungswerten führte (HALDER et al., 2019). Die labortechnisch nachweisbare, wirkungsvolle Antikoagulation von Warfarin wurde bisher noch nicht etabliert, weshalb die Dosisfindung dieser Antikoagulation wegen zahlreicher Interaktionen eine besondere Herausforderung darstellte.

Der Einfluss der Interaktion verschiedener Medikamente auf den enzymatischen Metabolismus zeigte sich in der Warfarin-Gruppe durch die zusätzliche Behandlung mit dem Antihelminthikum Fenbendazol, welches über das gleiche CYP-System wie Warfarin in der Leber abgebaut wird. Da es während der Dosisfindungsphase keine Nebenwirkungen mit der gleichen Warfarindosis gab, muss die zusätzliche Applikation von Fenbendazol einen Einfluss auf die antikoagulatorische Wirkung des

Warfarins gehabt haben, da alle Mäuse dieser Gruppe innerhalb von 48 Stunden nach Applikation des Futters an inneren Blutungen verstarben. Bei der Edoxaban-Gruppe verstarben bei der gleichzeitigen Behandlung mit Fenbendazol keine Mäuse an den unmittelbaren Folgen der Antikoagulation. Dieses Phänomen erklärt sich mit der geringen Interaktion von Edoxaban mit dem CYP3A4-System in der Leber. Selbst starke Inhibitoren dieses Enzyms (beispielsweise Imidazolderivate wie Fenbendazol) zeigten in der gemeinsamen Applikation kein erhöhtes Risiko einer Blutung (PARASRAMPURIA, TRUITT, 2016).

Mit Hilfe der Laser-Doppler-Messungen wurden die Auswirkungen der verschiedenen Medikamente zur Antikoagulation auf die Arteriogenese nach Femoralarterienligatur untersucht. Es konnte sowohl unmittelbar vor und nach dem Verschluss der A. femoralis, als auch drei, sieben und 14 Tage postoperativ kein signifikanter Unterschied in der Perfusion zwischen allen drei Gruppen gezeigt werden. Es konnte bereits gezeigt werden (SCHIRMER et al., 2009b), dass ein inflammatorisches Milieu eine gesteigerte Arteriogenese begünstigt, weshalb die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen IL1b (HANSSON, 2017), IL6 (GOPINATHAN et al., 2015), MCP1 (HONG et al., 2005; ITO et al., 1997) sowie TNFalpha (ARRAS et al., 1998) sowohl in Milzzellen, als auch in den beidseitigen Adduktoren gemessen wurde. Da sich sowohl in den Milz-, als auch in den Muskelzellen kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen zeigte, lässt sich aus dieser Untersuchung kein unterschiedlicher Einfluss der eingesetzten Antikoagulantien auf die Arteriogenese ableiten. Diese Beobachtung widerspricht Untersuchungen mit Rivaroxaban. In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Studien konnte bereits bei niedrigen Wirkstoffspiegeln des Faktor-Xa-Hemmers in verschiedenen Geweben eine signifikante Reduktion der inflammatorischen Zytokine gezeigt werden (HARA et al., 2015; ZHOU et al., 2011). Eine an Mäusen durchgeführte Studie, welche einen Wirkstoffspiegel nutzte, der auch beim Menschen therapeutisch eingesetzt wird, konnte diesen Effekt nochmals verstärkt wiedergeben (POSTHUMA et al., 2019). Einen möglichen Erklärungsansatz für die molekularen und makroskopischen Befunde könnte die für einen tierexperimentellen Ansatz typische geringe Zahl der Mäuse liefern. Obwohl in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass bereits 14 Tage nach der Femoralarterienligatur signifikante Unterschiede in der Hinterlaufperfusion detektiert werden können (SCHIRMER et al., 2015), könnte die Zeitspanne für diesen Versuch zu kurz sein. Diese Studie konnte aufdecken, dass Ausdauertraining einen proarteriogenen Einfluss besitzt, wodurch bereits nach drei Tagen signifikante Unterschiede zwischen der Placebo- und Interventionsgruppe in der LDI-Messung gemessen werden konnten. Das fehlende Ausdauertraining und damit ein fehlender proarteriogener Einflussfaktor auf die Mäuse in dieser Studie kann ein möglicher Erklärungsansatz für die fehlenden Unterschiede in der Hinterlaufperfusion darstellen. Sowohl Warfarin, als auch Edoxaban interagieren auf komplexe Weise mit biochemischen Vorgängen, welche ohne proarteriogene Einflüsse u. U. mehr Zeit benötigen, damit mit heute verfügbaren Methoden signifikante Unterschiede detektiert werden können.

Es konnte bereits makroskopisch gezeigt werden, dass VKA wie beispielsweise Warfarin eine verstärkte Kalzifizierung in verschiedenen Organen bewirken (SCHURGERS et al., 2012). Weiterhin ist der inhibitorische Einfluss von Warfarin auf das MGP bekannt, welches eine protektive Wirkung vor Fibrose zeigt. Zur Quantifizierung der Fibrosierung durch Antikoagulation wurden histologische Schnitte der Herzklappenebene durch die Nutzung der Sirius-Red-Färbemethode angefertigt. Im Vergleich zur Trichrom-Färbung, welche ebenfalls zur Fibrosedetektion genutzt werden kann, zeigt Sirius-Red eine größere Sensitivität für Fibrose durch Anfärbung von Kollagenfasern (HUANG et al., 2013). Hierbei zeigte sich eine signifikant verminderte Fibrosierung der Edoxaban-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- und Warfarin + Vitamin K1-Gruppe. Dies stützt die Hypothese des protektiven Einflusses der direkten Faktor-Xa-Hemmer auf die Atherosklerose.

Zur Detektion der Atherosklerose wurde die Ölrot-Färbemethode genutzt. Eine sehr ähnlich aufgebaute Studie an ApoE-Mäusen konnte zeigen, dass Warfarin im Vergleich zum Faktor-Xa-Hemmer Rivaroxaban eine gesteigerte Kalzifizierung im Bereich der Aortenklappe bewirkt (RATTAZZI et al., 2018). In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Rivaroxaban neben einer Inhibition des Fortschreitens der Atherosklerose bei längerfristiger Therapie sogar eine Regression dieser bewirkt (POSTHUMA et al., 2019). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dieser Studie mit Edoxaban, da auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestand.

Um Atherosklerose und Arteriogenese genauer untersuchen zu können, wurden immunhistochemische Schnitte der Mm. adductores angefertigt. Da Makrophagen eine wichtige Rolle sowohl in der Entstehung von Atherosklerose, als auch Arteriogenese spielen, wurde der von Makrophagen und Monozyten stark exprimierte Oberflächenmarker CD68 mittels fluoreszierender Antikörperfärbung dargestellt (CHISTIAKOV et al., 2017). Weiterhin spielt die Migration von glatten Muskelzellen zu inflammatorischen Arealen eine wichtige Rolle für die o. g. Prozesse (KUZUYA et al., 1995; SCHURGERS et al., 2018), weshalb auch dieser Zelltyp immunhistochemisch angefärbt und quantifiziert wurde. Da sich bei beiden Zelltypen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Medikamenten hinsichtlich ihrer Expression und Proliferation zeigte, validiert dieses Ergebnis die bereits durch die Laser-Doppler-Messungen gewonnenen Erkenntnisse.

Ausblick

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen heutzutage und wohl auch in Zukunft eine der wichtigsten Todesursachen dar, auch durch ein weiteres Altern der Gesellschaft. Ohne antikoagulatorische Therapiemöglichkeiten würden noch deutlich mehr Menschen an diesen Erkrankungen versterben. Durch dieses Altern treten bestimmte Krankheitsbilder wie beispielsweise das Vorhofflimmern oder die tiefe Beinvenenthrombose immer häufiger auf, welche die Indikation zur Antikoagulation bedingen. Da mit steigendem Alter auch die Prävalenz für arterielle Hypertonie ansteigt, welche neben dem Auftreten von Vorhofflimmern auch atherosklerotische Prozesse fördert, erscheint der Einsatz von NOAKs wegen ihres günstigen Einflusses auf die Atherosklerose als sinnvoll, da durch die Therapie im Vergleich zu VKA ein verlangsamtes Fortschreiten der Kalzifizierung bewirkt werden kann.

Auch aus diesem Grund steht die Antikoagulation mit NOAKs im Fokus der kardiovaskulären Forschung mit einer zunehmenden Zahl an großen klinischen Studien. Momentan befindet sich noch ein weiterer Faktor-Xa-Hemmer in klinischen Erprobungsstudien (QIU et al., 2018).

Die für die Zulassung der NOAKs durchgeführten multizentrischen Studien konnten bereits zeigen, dass diese ein oftmals besseres Nebenwirkungsprofil mit weniger großen Blutungsereignissen im Vergleich zu den klassischen VKA besitzen (EINSTEIN-INVESTIGATORS et al., 2010; PATEL et al., 2011). Insbesondere intrakranielle Blutungen sind unter einer NOAK-Therapie signifikant seltener im Vergleich zu Warfarin. So stellen NOAKs mittlerweile die Standardtherapie zur Behandlung des Vorhofflimmerns (KIRCHHOF et al., 2016; RUFF et al., 2014) und der tiefen Beinvenenthrombose (AGNELLI et al., 2013) dar.

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse untermauern bereits vorher gewonnene Erkenntnisse und können möglicherweise einen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen liefern. Weiterhin können diese Ergebnisse möglicherweise auch auf andere Strombahnen, als auf den Hinterlauf einer Maus übertragen werden, wie z. B. Koronararterien und Zerebralarterien.

In Zukunft sollte im Tierversuch der Einfluss von Warfarin auf Atherosklerose und Arteriogenese untersucht werden, in dem kein Vitamin K1 supplementiert wird, weil sich die in dieser und in anderen oben beschriebenen Studien gewonnenen Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen lassen, da die Mäuse noch über eine ausreichende Gerinnung verfügen. Dabei sollte auf den gesamten inhibitorischen Einfluss des Warfarins besonders Wert gelegt werden, da es neben den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X auch die antikoagulatorischen Proteine C und S inhibiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein niedriger Protein-C-Spiegel spontane Atherothrombosen

begünstigt (OUWENEEL et al., 2017). Bei Menschen mit einer genetisch bedingten niedrigen Expression von Protein C konnten bereits Unterschiede in der Progression der pAVK nachgewiesen werden (KOMAI et al., 2015).

Direkte Translationen aus tierexperimentellen Versuchen auf den Menschen können nicht erfolgen, so nimmt ein Mensch im Regelfall die Antikoagulantien über einen deutlich längeren Zeitraum (Jahre bis Jahrzehnte), weshalb trotz des langsameren Zellzyklus Prozesse wie Atherosklerose und Arteriogenese länger stattfinden und zu anderen Ergebnissen im Vergleich zum Mausmodell führen können, welches in diesem Fall auf acht Wochen Antikoagulation, davon zwei Wochen nach Intervention, limitiert war. Eine weitere Erforschung des Einflusses von oralen Antikoagulantien auf Atherosklerose und Arteriogenese ist auch zukünftig wichtig, da Warfarin in einigen Studien ähnliche Ergebnisse hinsichtlich einer vermehrten Kalzifizierung zeigte (HRISTOVA et al., 2010; TSAI et al., 2018). Weitere Langzeituntersuchungen von Patienten mit normaler Nierenfunktion erscheinen in diesem Zusammenhang sinnvoll.

Insgesamt unterstützen unsere Ergebnisse somit neuere Empfehlungen bezüglich des Einsatzes von NOAKs zur oralen Antikoagulation und deuten auf einen sinnvollen Einsatz auch bei Risikopatienten hin. Weitere Studien müssen zeigen, inwieweit unsere Ergebnisse auch klinische Relevanz bei Menschen zeigen.

7 Literaturverzeichnis

1. Agnelli G, Buller HR, Cohen A, Curto M, Gallus AS, Johnson M, Masiukiewicz U, Pak R, Thompson J, Raskob GE, Weitz JI, Investigators A (2013) Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med* 369:799-808
2. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101:40-50
3. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Chiuve SE, Cushman M, Delling FN, Deo R, de Ferranti SD, Ferguson JF, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jimenez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Lutsey PL, Mackey JS, Matchar DB, Matsushita K, Mussolino ME, Nasir K, O'Flaherty M, Palaniappan LP, Pandey A, Pandey DK, Reeves MJ, Ritchey MD, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sampson UKA, Satou GM, Shah SH, Spartano NL, Tirschwell DL, Tsao CW, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P, American Heart Association Council on E, Prevention Statistics C, Stroke Statistics S (2018) Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137:e67-e492
4. Böhm A, Flosser A, Ermler S, Fender AC, Luth A, Kleuser B, Schror K, Rauch BH (2013) Factor-Xa-induced mitogenesis and migration require sphingosine kinase activity and S1P formation in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 99:505-513
5. Breithardt G, Baumgartner H, Berkowitz SD, Hellkamp AS, Piccini JP, Stevens SR, Lokhnygina Y, Patel MR, Halperin JL, Singer DE, Hankey GJ, Hacke W, Becker RC, Nessel CC, Mahaffey KW, Fox KA, Califf RM, Committee RAS, Investigators (2014) Clinical characteristics and outcomes with rivaroxaban vs. warfarin in patients with non-valvular atrial fibrillation but underlying native mitral and aortic valve disease participating in the ROCKET AF trial. *Eur Heart J* 35:3377-3385
6. Camm AJ, Bounameaux H (2011) Edoxaban: a new oral direct factor xa inhibitor. *Drugs* 71:1503-1526
7. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395
8. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numaguchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T (2007) Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circ Res* 100:904-913
9. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV (2017) CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97:4-13
10. Connolly SJ, Milling TJ, Jr., Eikelboom JW, Gibson CM, Curnutte JT, Gold A, Bronson MD, Lu G, Conley PB, Verhamme P, Schmidt J, Middeldorp S, Cohen AT, Beyer-Westendorf J, Albaladejo P, Lopez-Sendon J, Goodman S, Leeds J, Wiens BL, Siegal DM, Zotova E, Meeks B, Nakamya J, Lim WT, Crowther M, Investigators A- (2016) Andexanet Alfa for Acute Major Bleeding Associated with Factor Xa Inhibitors. *N Engl J Med* 375:1131-1141
11. Connolly SJ, Crowther M, Eikelboom JW, Gibson CM, Curnutte JT, Lawrence JH, Yue P, Bronson MD, Lu G, Conley PB, Verhamme P, Schmidt J, Middeldorp S, Cohen AT, Beyer-Westendorf J, Albaladejo P, Lopez-Sendon J, Demchuk AM, Pallin DJ, Concha M, Goodman S, Leeds J, Souza S, Siegal DM, Zotova E, Meeks B, Ahmad S, Nakamya J, Milling TJ, Jr.,

- Investigators A- (2019) Full Study Report of Andexanet Alfa for Bleeding Associated with Factor Xa Inhibitors. *N Engl J Med* 380:1326-1335
12. Daiichi Sankyo Co. L (2014). Savaysa / Edoxaban tablets, Safety Data Sheet
 13. Davies MJ (2000) The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 83:361-366
 14. Duguid JB (1949) Pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet* 2:925-927
 15. Einstein-Investigators, Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B, Buller HR, Decousus H, Gallus AS, Lensing AW, Misselwitz F, Prins MH, Raskob GE, Segers A, Verhamme P, Wells P, Agnelli G, Bounameaux H, Cohen A, Davidson BL, Piovella F, Schellong S (2010) Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. *N Engl J Med* 363:2499-2510
 16. Eto M, Barandier C, Rathgeb L, Kozai T, Joch H, Yang Z, Luscher TF (2001) Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ Res* 89:583-590
 17. Ferrante AW, Jr. (2007) Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 262:408-414
 18. Freedman MD (1992) Oral anticoagulants: pharmacodynamics, clinical indications and adverse effects. *J Clin Pharmacol* 32:196-209
 19. French JE (1966) Atherosclerosis in relation to the structure and function of the arterial intima, with special reference to the endothelium. *Int Rev Exp Pathol* 5:253-353
 20. Furugohri T, Isobe K, Honda Y, Kamisato-Matsumoto C, Sugiyama N, Nagahara T, Morishima Y, Shibano T (2008) DU-176b, a potent and orally active factor Xa inhibitor: in vitro and in vivo pharmacological profiles. *J Thromb Haemost* 6:1542-1549
 21. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, Murphy SA, Wiviott SD, Halperin JL, Waldo AL, Ezekowitz MD, Weitz JI, Spinar J, Ruzyllo W, Ruda M, Koretsune Y, Betcher J, Shi M, Grip LT, Patel SP, Patel I, Hanyok JJ, Mercuri M, Antman EM, Investigators EA-T (2013) Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 369:2093-2104
 22. Gopinathan G, Milagre C, Pearce OM, Reynolds LE, Hodivala-Dilke K, Leinster DA, Zhong H, Hollingsworth RE, Thompson R, Whiteford JR, Balkwill F (2015) Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Res* 75:3098-3107
 23. Halder M, Petsophonsakul P, Akbulut AC, Pavlic A, Bohan F, Anderson E, Maresz K, Kramann R, Schurgers L (2019) Vitamin K: Double Bonds beyond Coagulation Insights into Differences between Vitamin K1 and K2 in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 20
 24. Hansson GK (2017) Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy. *Circulation* 136:1875-1877
 25. Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, Yagi S, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M (2015) Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 242:639-646
 26. Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD (2004) Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1207-1213

27. Holden RM, Hetu MF, Li TY, Ward EC, Couture LE, Herr JE, Christilaw E, Adams MA, Johri AM (2019) Circulating Gas6 is associated with reduced human carotid atherosclerotic plaque burden in high risk cardiac patients. *Clin Biochem* 64:6-11
28. Hong KH, Ryu J, Han KH (2005) Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 105:1405-1407
29. Hristova M, van Beek C, Schurgers LJ, Lanske B, Danziger J (2010) Rapidly progressive severe vascular calcification sparing the kidney allograft following warfarin initiation. *Am J Kidney Dis* 56:1158-1162
30. Huang Y, de Boer WB, Adams LA, MacQuillan G, Rossi E, Rigby P, Raftopoulos SC, Bulsara M, Jeffrey GP (2013) Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver Int* 33:1249-1256
31. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W (1997) Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 80:829-837
32. Jaffer IH, Stafford AR, Fredenburgh JC, Whitlock RP, Chan NC, Weitz JI (2015) Dabigatran is Less Effective Than Warfarin at Attenuating Mechanical Heart Valve-Induced Thrombin Generation. *J Am Heart Assoc* 4:e002322
33. Jahnchen E, Meinertz T, Gilfrich HJ, Groth U, Martini A (1976) The enantiomers of phenprocoumon: pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. *Clin Pharmacol Ther* 20:342-349
34. Jiang X, Tao H, Qiu C, Ma X, Li S, Guo X, Lv A, Li H (2016) Vitamin K2 regression aortic calcification induced by warfarin via Gas6/Axl survival pathway in rats. *Eur J Pharmacol* 786:10-18
35. Kalz J, ten Cate H, Spronk HM (2014) Thrombin generation and atherosclerosis. *J Thromb Thrombolysis* 37:45-55
36. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, Castella M, Diener HC, Heidbuchel H, Hendriks J, Hindricks G, Manolis AS, Oldgren J, Popescu BA, Schotten U, Van Putte B, Vardas P, Group ESCSD (2016) 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J* 37:2893-2962
37. Komai H, Shindo S, Sato M, Ogino H (2015) Reduced Protein C Activity Might be Associated With Progression of Peripheral Arterial Disease. *Angiology* 66:584-587
38. Koo BH, Kim DS (2003) Factor Xa induces mitogenesis of vascular smooth muscle cells via autocrine production of epiregulin. *J Biol Chem* 278:52578-52586
39. Kruger T, Oelenberg S, Kaesler N, Schurgers LJ, van de Sandt AM, Boor P, Schlieper G, Brandenburg VM, Fekete BC, Veulemans V, Ketteler M, Vermeer C, Jahnchen-Dechent W, Floege J, Westenfeld R (2013) Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2618-2624
40. Kuchipudi SV, Tellabati M, Nelli RK, White GA, Perez BB, Sebastian S, Slomka MJ, Brookes SM, Brown IH, Dunham SP, Chang KC (2012) 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. *Virol J* 9:230

41. Kuzuya M, Satake S, Esaki T, Yamada K, Hayashi T, Naito M, Asai K, Iguchi A (1995) Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque. *J Cell Physiol* 164:658-667
42. Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-874
43. Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386:78-81
44. Malik TF, Tivakaran VS (2018). Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (PTCA). In *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
45. Mann KG (1999) Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 82:165-174
46. Mansour AG, Hariri E, Daaboul Y, Korjian S, El Alam A, Protogerou AD, Kilany H, Karam A, Stephan A, Bahous SA (2017) Vitamin K2 supplementation and arterial stiffness among renal transplant recipients-a single-arm, single-center clinical trial. *J Am Soc Hypertens* 11:589-597
47. Meier P, Hemingway H, Lansky AJ, Knapp G, Pitt B, Seiler C (2012) The impact of the coronary collateral circulation on mortality: a meta-analysis. *Eur Heart J* 33:614-621
48. Moore KJ, Tabas I (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145:341-355
49. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, Juni P, Kastrati A, Koller A, Kristensen SD, Niebauer J, Richter DJ, Seferovic PM, Sibbing D, Stefanini GG, Windecker S, Yadav R, Zembala MO, Group ESCSD (2019) 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* 40:87-165
50. Occupational Health Services I (1994). MSDS for Warfarin
51. Ouweneel AB, Heestermans M, Verwilligen RAF, Gijbels MJJ, Reitsma PH, Van Eck M, van Vlijmen BJM (2017) Silencing of Anticoagulant Protein C Evokes Low-Incident but Spontaneous Atherothrombosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37:782-785
52. Palareti G, Legnani C (1996) Warfarin withdrawal. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet* 30:300-313
53. Parasrampur DA, Truitt KE (2016) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Edoxaban, a Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant that Inhibits Clotting Factor Xa. *Clin Pharmacokinet* 55:641-655
54. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, Pan G, Singer DE, Hacke W, Breithardt G, Halperin JL, Hankey GJ, Piccini JP, Becker RC, Nessel CC, Paolini JF, Berkowitz SD, Fox KA, Califf RM, Investigators RA (2011) Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med* 365:883-891
55. Petrie MC, Jhund PS, She L, Adlbrecht C, Doenst T, Panza JA, Hill JA, Lee KL, Rouleau JL, Prior DL, Ali IS, Maddury J, Golba KS, White HD, Carson P, Chrzanowski L, Romanov A, Miller AB, Velazquez EJ, Investigators ST (2016) Ten-Year Outcomes After Coronary Artery Bypass Grafting According to Age in Patients With Heart Failure and Left Ventricular

Systolic Dysfunction: An Analysis of the Extended Follow-Up of the STICH Trial (Surgical Treatment for Ischemic Heart Failure). *Circulation* 134:1314-1324

56. Posthuma JJ, Posma JJN, van Oerle R, Leenders P, van Gorp RH, Jaminon AMG, Mackman N, Heitmeier S, Schurgers LJ, Ten Cate H, Spronk HMH (2019) Targeting Coagulation Factor Xa Promotes Regression of Advanced Atherosclerosis in Apolipoprotein-E Deficient Mice. *Sci Rep* 9:3909
57. Prado CM, Ramos SG, Elias J, Jr., Rossi MA (2008) Turbulent blood flow plays an essential localizing role in the development of atherosclerotic lesions in experimentally induced hypercholesterolaemia in rats. *Int J Exp Pathol* 89:72-80
58. Price PA, Faus SA, Williamson MK (1998) Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1400-1407
59. Qiu X, Wang W, Zhao Z, Sun S, Tang L (2018) Pre-clinical pharmacodynamic study of a novel oral factor Xa inhibitor zifaxaban. *Eur J Pharmacol* 836:50-56
60. Randolph GJ (2014) Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res* 114:1757-1771
61. Rattazzi M, Faggini E, Bertacco E, Nardin C, Pagliani L, Plebani M, Cinetto F, Guidolin D, Puato M, Pauletto P (2018) Warfarin, but not rivaroxaban, promotes the calcification of the aortic valve in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Ther* 36:e12438
62. Ross R, Glomset J, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86:675-684
63. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, Hoffman EB, Deenadayalu N, Ezekowitz MD, Camm AJ, Weitz JJ, Lewis BS, Parkhomenko A, Yamashita T, Antman EM (2014) Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 383:955-962
64. Schaper J, König R, Franz D, Schaper W (1976) The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 370:193-205
65. Schaper W (2009) Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol* 104:5-21
66. Schirmer SH, Fledderus JO, van der Laan AM, van der Pouw-Kraan TC, Moerland PD, Volger OL, Baggen JM, Böhm M, Piek JJ, Horrevoets AJ, van Royen N (2009a) Suppression of inflammatory signaling in monocytes from patients with coronary artery disease. *J Mol Cell Cardiol* 46:177-185
67. Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N (2009b) Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* 95:191-197
68. Schirmer SH, Baumhakel M, Neuberger HR, Hohnloser SH, van Gelder IC, Lip GY, Böhm M (2010) Novel anticoagulants for stroke prevention in atrial fibrillation: current clinical evidence and future developments. *J Am Coll Cardiol* 56:2067-2076
69. Schirmer SH, Millenaar DN, Werner C, Schuh L, Degen A, Bettink SI, Lipp P, van Rooijen N, Meyer T, Böhm M, Laufs U (2015) Exercise promotes collateral artery growth mediated by monocytic nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:1862-1871

70. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W (2000) Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* 436:257-270
71. Schurgers LJ, Joosen IA, Laufer EM, Chatrou ML, Herfs M, Winkens MH, Westenfeld R, Veulemans V, Krueger T, Shanahan CM, Jahnke-Dechent W, Biessen E, Narula J, Vermeer C, Hofstra L, Reutelingsperger CP (2012) Vitamin K-antagonists accelerate atherosclerotic calcification and induce a vulnerable plaque phenotype. *PLoS One* 7:e43229
72. Schurgers LJ, Akbulut AC, Kaczor DM, Halder M, Koenen RR, Kramann R (2018) Initiation and Propagation of Vascular Calcification Is Regulated by a Concert of Platelet- and Smooth Muscle Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Front Cardiovasc Med* 5:36
73. Seiler C, Engler R, Berner L, Stoller M, Meier P, Steck H, Traupe T (2013) Prognostic relevance of coronary collateral function: confounded or causal relationship? *Heart* 99:1408-1414
74. Seimon T, Tabas I (2009) Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl:S382-387
75. Shyy JY, Chien S (1997) Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 9:707-713
76. Statistisches Bundesamt (2016). Die 10 häufigsten Todesursachen
77. Tsai MT, Chen YY, Chang WJ, Li SY (2018) Warfarin accelerated vascular calcification and worsened cardiac dysfunction in remnant kidney mice. *J Chin Med Assoc* 81:324-330
78. Turk MW, Tuite PK, Burke LE (2009) Cardiac health: primary prevention of heart disease in women. *Nurs Clin North Am* 44:315-325
79. Virchow R (1856) Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin* (Frankfurt, Meidinger, Sohn und Co.).
80. Vries MH, Wagenaar A, Verbruggen SE, Molin DG, Dijkgraaf I, Hackeng TH, Post MJ (2015) CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the pericollateral space. *Angiogenesis* 18:163-171
81. Wang JC, Bennett M (2012) Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res* 111:245-259
82. WHO (2016). Cardiovascular Diseases
83. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, Bostrom KI (2010) Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 107:485-494
84. Zhou Q, Bea F, Preusch M, Wang H, Isermann B, Shahzad K, Katus HA, Blessing E (2011) Evaluation of plaque stability of advanced atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice after treatment with the oral factor Xa inhibitor rivaroxaban. *Mediators Inflamm* 2011:432080

8 Publikationen

Im Rahmen der Anfertigung der vorgelegten Dissertation sind die folgende Publikation bzw. das folgende Abstract entstanden:

Publikation:

Millenaar DN, **Bachmann P**, Böhm M, Custodis F, Schirmer SH (2019) Effects of edoxaban and warfarin on vascular remodeling: atherosclerotic plaque progression and collateral artery growth. *Eingereicht*

Abstract:

Bachmann P, Millenaar DN, Böhm M, Custodis F, Schirmer SH (2019) Effekte von Edoxaban und Warfarin auf vaskuläres Remodeling: Atherosklerotische Plaqueprogression und Kollateralarterienwachstum. *Eingereicht*

9 Dank

Bedanken möchte ich mich zuerst bei Prof. Dr. M. Böhm für seine Unterstützung und die Möglichkeit, meine Dissertation in den Laboren der Klinik für Innere Medizin III der Universitätskliniken des Saarlandes anzufertigen.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Stephan Schirmer, möchte ich für das Überlassen dieses spannenden Themas für meine Dissertation und sein Vertrauen danken. Auf diese Weise hat er es mir ermöglicht, meine ersten wissenschaftlichen Erfahrungen zu sammeln. Durch sein breites wissenschaftliches Wissen konnte er mir dabei immer wertvolle Hilfestellungen geben.

Meinem Betreuer, Dr. Dominic Millenaar, möchte ich für die exzellente Betreuung besonders danken. Er war mir zu jeder Zeit und bei jeder Frage ein guter Ansprechpartner. Durch die vielen interessanten Gespräche und seine konstruktive Kritik ist er für die erfolgreiche Anfertigung meiner Dissertationsarbeit mitverantwortlich.

Sowohl Prof. Dr. Dr. Schirmer, als auch Dr. Millenaar haben mich in jeder Phase unterstützt und neben meinem Interesse an der Wissenschaft und am wissenschaftlichen Arbeiten auch mein Interesse an der Kardiologie weiter geweckt. Dafür möchte ich beiden herzlich danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Nina Rebmann und dem Team des dermatologischen Forschungslabors für ihre Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt der medizinisch-technischen Assistentin unserer Arbeitsgruppe, Frau Julia Weber. Durch ihre gewissenhafte und geduldige Einarbeitung und Hilfe sowohl beim Umgang mit den Versuchstieren, als auch bei den späteren Versuchen im Labor hat sie es mir ermöglicht, meine ersten eigenständigen „Gehversuche“ im Labor zu wagen und Spaß am praktischen wissenschaftlichen Arbeiten zu bekommen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder Jonas bedanken, die mich zu jeder Phase meines Studiums unterstützt und mir geholfen haben, den Blick für das Wesentliche nicht zu verlieren.